

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Pavla Dvořáková

**Vlastnosti expresních vektorů pro *Corynebacterium glutamicum* a jejich využití při
studiu faktorů sigma RNA polymerasy**

Characteristics of expression vectors for *Corynebacterium glutamicum* and their use for
studies of sigma factors of RNA polymerase

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Pátek, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 4. 2017

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především svému školiteli Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za jeho odborné vedení, vstřícný přístup, trpělivost a obětavost při zpracovávání této diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat všem kolegům z Laboratoře molekulární genetiky bakterií za vřelou pomoc a cenné rady při experimentální činnosti a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Mé velké díky patří zejména RNDr. Lence Rucké, Ph.D., Mgr. Haně Dostálové, Mgr. Jiřímu Holátkovi, Ph.D., Mgr. Robertu Rādischovi a Anně Stachové. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Nešverovi, CSc. a RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. za postřehy a praktické připomínky při sepisování této práce.

Děkuji také Ing. Petru Haladovi, Ph.D. za identifikaci proteinu σ^M pomocí hmotnostní spektrometrie a RNDr. Janu Svobodovi, Ph.D. za analýzu populace buněk *C. glutamicum* průtokovou cytometrií.

V neposlední řadě velice děkuji své rodině za neocenitelnou podporu během celého studia.

Abstrakt

Cílem práce bylo charakterizovat vybrané expresní vektory pro biotechnologicky významný bakteriální druh, *Corynebacterium glutamicum*, a testovat možnosti jejich využití při studiu řízení aktivity promotorů faktory sigma RNA polymerasy. Měřením míry exprese modelového genu *gfpuv* stanovením intenzity fluorescence produkovaného proteinu a použitím analýzy populace buněk *C. glutamicum* exprimujících gen *gfpuv* pomocí průtokové cytometrie byly u studovaných vektorů zjištěny odlišné vlastnosti: míra exprese klonovaného genu, bazální hladina exprese bez induktoru, závislost míry exprese na koncentraci induktoru a stupeň homogenity buněk z hlediska exprese genu *gfpuv*. Pro testování bipiasmidového systému pro přiřazení faktoru sigma k vybranému promotoru byl zvolen vektor pEC-XT99A, který sice neměl vysokou účinnost exprese, ale nevykazoval bazální expresi, exprese byla srovnatelná v širší škále koncentrací induktoru IPTG a buněčná populace byla z hlediska exprese modelového genu zcela homogenní. S využitím vektoru pEC-XT99A, který exprimoval jednotlivé geny pro stresové faktory sigma, byl dosud neznámému promotoru *Pcg0420* jednoznačně přiřazen faktor σ^D , který řídil jeho funkci. Další vektor, určený pro izolaci a purifikaci proteinů z *C. glutamicum*, umožnil expresi genu *sigM* z *C. glutamicum* a izolaci proteinu σ^M zatím pouze v nerozpustné formě. Všechny vektory budou dále použity v experimentální práci v Laboratoři molekulární genetiky bakterií.

Klíčová slova: exprese, vektor, expresní vektor, *Corynebacterium glutamicum*, faktor sigma, promotor, promotor-test vektor, *gfpuv*, izolace proteinu

Abstract

The aim of the thesis was to characterize chosen expression vectors used in biotechnologically important bacterial species, *Corynebacterium glutamicum*, and to test their use in studies of promoter activity control by sigma factors of RNA polymerase. Different properties of these vectors (level of expression of the cloned gene, leaky expression without inducer, dependence of expression level on inducer concentration and cell population homogeneity) were found by determination of expression level of the model *gfpuv* gene by fluorescence intensity assay of the produced protein and by *gfpuv*-expressing *C. glutamicum* cell population analysis using flow cytometry. The vector pEC-XT99A was chosen for testing the bi-plasmid system for assignment of a sigma factor to the chosen promoter. Although the level of expression provided by pEC-XT99A was not high, the vector showed no leaky expression, expression from the vector was comparable for a wide range of IPTG concentrations and the cell population was homogenous concerning the gene expression. Using pEC-XT99A from which individual stress *sig* genes were expressed, the σ^D factor was clearly assigned to the up-to-now unknown *Pcg0420* promoter. Another vector for isolation and purification of *C. glutamicum* proteins was used to express the *C. glutamicum sigM* gene and to isolate the σ^M protein, although in its insoluble form. All vectors will be used for experimental work in the Laboratory of Molecular Genetics of Bacteria.

Key words: expression, vector, expression vector, *Corynebacterium glutamicum*, factor sigma, promoter, promoter-probe vector, *gfpuv*, protein isolation

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce	11
3	Literární přehled.....	12
3.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	12
3.1.1	Využití <i>C. glutamicum</i>	12
3.2	Exprese genů	13
3.2.1	Promotory.....	14
3.2.1.1	Promotory <i>C. glutamicum</i>	15
3.2.2	RNA polymerasa.....	16
3.3	Faktory σ RNA polymerasy	17
3.3.1	Faktory z rodiny σ^{70}	18
3.3.2	Faktory z rodiny σ^{54}	19
3.4	Faktory σ RNA polymerasy v <i>C. glutamicum</i>	19
3.4.1	Faktor σ^A	19
3.4.2	Faktor σ^B	20
3.4.3	Faktor σ^C	21
3.4.4	Faktor σ^D	21
3.4.5	Faktor σ^E	21
3.4.6	Faktor σ^H	22
3.4.7	Faktor σ^M	22
3.5	Plasmidové vektory	23
3.5.1	Expresní vektory	25
3.5.2	Vektory <i>C. glutamicum</i>	26
3.5.2.1	Klonovací vektory <i>C. glutamicum</i>	27
3.5.2.2	Expresní vektory <i>C. glutamicum</i>	28
3.5.2.3	Promotor-test vektory <i>C. glutamicum</i> pro studium regulace exprese genů.....	30
4	Materiál a metody	32
4.1	Přístrojové vybavení.....	32
4.2	Software	33
4.3	Chemikálie	33
4.4	Puify.....	35
4.5	Kultivační média	35
4.6	Komerční soupravy	37
4.7	Oligonukleotidové primery	37
4.8	Bakteriální kmeny	37

4.9	Plasmidy	37
4.10	Kultivace bakterií <i>Escherichia coli</i> a <i>Corynebacterium glutamicum</i>	39
4.10.1	Měření optické density	39
4.11	Dlouhodobé uchovávání kmenů v glycerolové konzervě	39
4.12	Izolace nukleových kyselin	40
4.12.1	Izolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i> pomocí komerční soupravy	40
4.12.2	Miniizolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i>	40
4.12.3	Izolace plasmidové DNA z <i>C. glutamicum</i> pomocí komerční soupravy	41
4.13	Extrakce DNA fenolem	42
4.14	Precipitace DNA ethanolem	42
4.15	Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu	43
4.16	Polymerasová řetězcová reakce (PCR)	43
4.16.1	Přečištění fragmentu po PCR pomocí komerční soupravy	44
4.17	Štěpení DNA restrikčními enzymy	45
4.18	Ligace lineárních fragmentů DNA	45
4.19	Transformace <i>E. coli</i>	46
4.19.1	Příprava kompetentních buněk	46
4.19.2	Transformace <i>E. coli</i>	46
4.20	Transformace <i>C. glutamicum</i>	47
4.20.1	Příprava kompetentních buněk <i>C. glutamicum</i>	47
4.20.2	Transformace <i>C. glutamicum</i> elektroporací	47
4.21	Měření intenzity fluorescence	48
4.21.1	Měření intenzity fluorescence v bezbuněčném extraktu	48
4.21.2	Měření intenzity fluorescence buněk <i>C. glutamicum</i>	49
4.22	Měření koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu	50
4.23	Analýza populace buněk <i>C. glutamicum</i> průtokovou cytometrií	50
4.24	Indukce exprese genu pro produkci proteinu	51
4.25	Indukce exprese genu při vysokoprodukční kultivaci	52
4.26	Izolace proteinů metodou afinitní chromatografie	52
4.26.1	Zakoncentrování eluátů a dialýza	53
4.27	Močovinová extrakce proteinů	54
4.28	Elektroforetická analýza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	54
4.28.1	Barvení a odbarvování polyakrylamidového gelu	55
5	Výsledky	56
5.1	Stanovení míry genové exprese při použití vektorů pEC-XT99A, pEKEx3 a pCLTON1	56

5.1.1	Příprava klonů <i>C. glutamicum</i> nesoucích expresní vektory s vloženým modelovým genem <i>gfpuv</i>	56
5.1.2	Stanovení míry genové exprese v bezbuněčném extraktu působením různé koncentrace induktoru	57
5.1.3	Porovnání exprese genu <i>gfpuv</i> u všech studovaných expresních vektorů při souběžné kultivaci	63
5.2	Analýza populace buněk <i>C. glutamicum</i> exprimujících <i>gfpuv</i> z různých expresních vektorů	65
5.3	Zjištění závislosti promotoru <i>Pcg0420</i> na faktoru σ	72
5.4	Použití expresního vektoru pMKEx2 pro produkci proteinu v kmeni <i>C. glutamicum</i> MB001	75
5.4.1	Klonování genu <i>sigM</i> v expresním vektoru pMKEx2	75
5.5	Izolace proteinu σ^M	76
6	Diskuze	78
6.1	Porovnání exprese genu <i>gfpuv</i> z expresních vektorů pEC-XT99A, pEKEEx3 a pCLTON1	78
6.2	Průtoková cytometrie populace buněk <i>C. glutamicum</i>	80
6.3	Závislost promotoru <i>Pcg0420</i> na faktoru σ	81
6.4	Expresce genu <i>sigM</i> a izolace proteinu σ^M	82
7	Souhrn	83
8	Seznam citované literatury	84

Seznam zkratek

A – absorbance

Ap – ampicilin

APS – peroxodisíran amonný

ATP – adenosintrifosfát

AU (*arbitrary unit*) – neměrná jednotka

bp – páry bází

BSA (*bovine serum albumin*) – hovězí sérový albumin

cDNA (*complementary DNA*) – komplementární DNA

Da – jednotka Dalton

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát

E. coli – *Escherichia coli*

ECF (*extracytoplasmatic factor*) – faktor s extracytoplasmatickou funkcí

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EtOH – ethanol

GFP – zelený fluorescenční protein

GRAS (*generally recognized as safe*) – obecně uznán jako bezpečný

IPTG – isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

kb – tisíc párů bází

Km – kanamycin

RT (*room temperature*) – laboratorní teplota

Mb – milion párů bází

MCS (*multiple cloning site*) – mnohonásobné klonovací místo

MOPS – 3-(N-morpholino)propanosulfonová kyselina

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

OD₆₀₀ – optická densita při vlnové délce 600 nm

PCR (*polymerase chain reaction*) – polymerasová řetězcová reakce

PEG – polyethylenglykol

PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid

ppGpp – guanosin 3',5'-bispyrofosfát

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – sodiumdodecylsulfát

SDS-PAGE – SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

Sp – spektinomycin

Tc – tetracyklin

TEMED – tetramethylethylendiamin

Tm (*melting temperature*) – teplota tání

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

TSP – transkripční počátek

v/v (*volume/volume*) – koncentrace vyjádřena jako poměr objemů látek

w/v (*weight/volume*) – koncentrace látky v rozpouštědle

wt (*wild type*) – divoký kmen

x g – násobek tíhového zrychlení

σ – sigma

1 Úvod

Bakterie *Corynebacterium glutamicum* je jako producent L-glutamové kyseliny a jiných aminokyselin nebo organických látek využívána v průmyslové výrobě. Vzhledem k jejím metabolickým vlastnostem je taktéž užitečná pro produkci cizorodých proteinů. Z těchto důvodů jsou konstruovány plasmidové expresní vektory, které jsou určeny právě pro *C. glutamicum*.

Plasmidové expresní vektory bakterií umožňují zvýšenou expresi vybraných vlastních genů hostitele nebo cizorodých genů libovolného původu. Produkty zvýšené exprese genů (proteiny) je možné využít v molekulární genetice, biochemii i biotechnologii. Nadprodukce enzymů nebo proteinových regulátorů se může uplatnit při zkoumání regulačních mechanismů v bakteriální buňce, přípravě a charakterizaci enzymů, produkci žádaných metabolitů v biotechnologických procesech nebo naopak při degradaci toxických látek, které zatěžují životní prostředí.

Expresních vektorů specifických pro průmyslové kmeny *Corynebacterium glutamicum* v posledních letech přibýlo. Mají rozmanité vlastnosti a možnosti klonování genů. V případě hledání dostupných expresních vektorů pro specifický účel je stále nedostatek informací pro racionální výběr vhodného vektoru. Jedním z možných účelů použití expresních vektorů je analýza funkce regulátorů transkripce. Takový projekt, v němž je studována závislost aktivity promotorů různých typů (tříd) na různých podjednotkách sigma (σ) RNA polymerasy u *C. glutamicum*, je řešen v Laboratoři molekulární genetiky Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. Cílem této práce je charakterizovat expresní vektory z hlediska jejich možného použití v tomto projektu.

2 Cíle práce

- Charakterizovat expresní vektory pEC-XT99A, pEKEx3 a pCLTON1 pro *Corynebacterium glutamicum* s použitím modelového (reportérového) genu *gfpuv*
- Použít jeden z vektorů (vybraný na základě jeho zjištěných vlastností) pro přiřazení konkrétního faktoru sigma zvolenému promotoru, který se uplatňuje při stresové odpovědi
- Zkonstruovat plasmid pMKEx2-*sigM*, který by umožnil purifikaci proteinu σ^M afinitní chromatografií
- Použít expresní vektor pMKEx2 pro izolaci a purifikaci proteinu σ^M z *C. glutamicum*
- Použít izolovaný faktor σ^M při transkripci *in vitro* v systému pro *C. glutamicum*.

3 Literární přehled

3.1 *Corynebacterium glutamicum*

Grampozitivní půdní bakterie *Corynebacterium glutamicum* se řadí do kmene *Actinobacteria* a řádu *Actinomycetales*. Je to aerobní až fakultativně anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru bez schopnosti aktivního pohybu.

Bakterie *C. glutamicum* byla objevena japonskými vědci roku 1957 jako přírodní producent L-glutamové kyseliny (Kinoshita *et al.*, 1957). Zjistilo se, že *C. glutamicum* produkuje více druhů L-aminokyselin, např. kyselinu L-asparagovou (Park a Lee, 2010), L-lysin (Ohnishi *et al.*, 2002) nebo L-valin (Blombach *et al.*, 2007). Podrobnější studie této bakterie ukázaly, že její metabolické schopnosti jsou různorodější, než se očekávalo. Proto byly vyvinuty kmeny, které za určitých podmínek produkují mnoho dalších užitečných látek, např. za nedostatku kyslíku laktát (Dominguez *et al.*, 1993) nebo sukcinát (Inui *et al.*, 2004b) a kmen bez pyruvát dehydrogenasy vykazuje zvýšenou produkci pyruvátu (Wieschalka *et al.*, 2012). *C. glutamicum* je také schopna produkce biopaliv, např. ethanolu (Inui *et al.*, 2004a) či isobutanolu (Smith *et al.*, 2010), a dále produkuje kadaverin (Becker *et al.*, 2012), další organické kyseliny (Wieschalka *et al.*, 2013) nebo vitamíny, např. pantothenát (Sahm a Eggeling, 1999).

Pro zvýšení výnosu se začaly připravovat produkční kmeny nejprve metodou mutagenese a selekce, později pomocí technik genetického inženýrství. Vzhledem k tomu, že byla *C. glutamicum* schválena jako bezpečná ze zdravotního hlediska (GRAS – *generally recognized as safe*), mohou se produkty jejího metabolismu využívat v různých odvětvích od potravinářského či krmivářského průmyslu až po farmaceutický průmysl (Leuchtenberger *et al.*, 2005).

3.1.1 Využití *C. glutamicum*

Po stanovení sekvence genomu *C. glutamicum* (3,28 Mb) mohlo být zahájeno studium genové exprese a regulačních mechanismů, promotorů a regulačních sekvencí s využitím téměř všech metod molekulární genetiky (Kalinowski *et al.*, 2003). Doposud byly zdokonaleny hlavně metody pro přípravu kmenů s vysokou produkcí aminokyselin (Stäbler *et al.*, 2011). Započal vývoj pro zdokonalení exprese genů a studium genové exprese za použití indukovatelných a reprimovatelných expresních systémů, zkonstruovaných přímo v chromosomu *C. glutamicum*. Tato strategie genetické

manipulace by mohla obcházet použití klonovacích vektorů a genů pro rezistence vůči antibiotikům v průmyslových produkčních kmenech, což je legislativně omezováno (Frewer a Shepherd, 1995).

V posledních několika letech se tato bakterie stala předmětem zájmu nejen ve vědeckých laboratořích, ale i v mnoha biotechnologických firmách. Možnost uplatnění *C. glutamicum* v průmyslové výrobě aminokyselin a znalost genomu podnítily ke zkoumání biosyntetických drah a snahu o využití celkového metabolického potenciálu. Nejprve byly známy geny pro syntézu aminokyselin a po osekvenování genomu se začalo s metodami vkládání genů pro utilizaci jiných substrátů (pentos, lignocelulosa, xylosy) (Sasaki *et al.*, 2009; Buschke *et al.*, 2013) nebo genů pro syntézu karboxylových kyselin (Sanchez a Demain, 2008).

Nedostatečné znalosti procesu iniciace transkripce a funkce transkripčních signálů, které ovlivňují hladinu exprese, dosud brzdí další vývoj produkčních kmenů. Tyto poznatky by umožnily vytvořit bakteriální kmeny, které by zajistily nadprodukcí zvolených proteinů a u nichž by bylo možné přesně nastavit a regulovat hladinu exprese genů konkrétní biosyntetické dráhy (Vašicová *et al.*, 1999). Znalost centrálního metabolismu *C. glutamicum* může přispět také k výzkumu příbuzných grampozitivních bakterií a *C. glutamicum* lze nyní považovat za modelový organismus.

U kmenů, používaných pro biotechnologické účely, je snaha o zmenšení genomu rozsáhlými delecemi v chromosomu, čímž by se docílilo zvýšení účinnosti exprese genů a následně efektivity produkce proteinů, pro kterou jsou konkrétní kmeny využívány (Suzuki *et al.*, 2005). Odstraňují se úseky genomu bez známé funkce, a pokud není narušena životaschopnost buňky, může být energie zužitkována pro expresi genů kódujících žádoucí proteiny. Postupnou delecí velkých segmentů DNA v chromosomu bylo dosud docíleno zmenšení velikosti genomu až o 22 % (Unthan *et al.*, 2014).

3.2 Exprese genů

Proces přenosu genetické informace DNA vedoucí k syntéze proteinů, při kterém dochází k transkripci a k translaci vzniklých transkriptů, se u jednotlivých genů liší v závislosti na mnoha faktorech. Míra exprese genů je řízena řadou regulačních mechanismů na několika úrovních: transkripční, posttranskripční, translační nebo posttranslační. Vždy je zajištěna dostatečně vysoká hladina exprese určitých genů, která je za daných podmínek nutná pro růst, vývoj a zabezpečení životních funkcí organismu.

Z tohoto důvodu je exprese genů závislá také na fázi růstu buňky a při regulaci exprese strukturních genů hraje důležitou roli i buněčná odpověď na stimuly z vnějšího prostředí (Mason *et al.*, 1999). Záleží na tom, zda je přítomno dostatečné množství živin nebo zda se buňka nachází ve stresujícím prostředí kvůli nedostatku živin či z důvodu přítomnosti látek, které negativně ovlivňují její životaschopnost (Farewell *et al.*, 1996). Veškeré regulační mechanismy vyvolají buď zvýšení, snížení nebo až úplné zastavení exprese genů.

O tom, jak silná je exprese genu, rozhoduje mimo jiné promotor daného genu, což je specifický úsek DNA před každým genem a je důležitou oblastí pro nasednutí RNA polymerasy a zahájení procesu transkripce. Podrobnějším popisem se budu zabývat v kapitole 3.2.1 Promotory.

Při studiu genové exprese a zjišťování míry exprese genu je možné měřit hladinu exprese tohoto genu přepisovaného v buňce za konkrétních podmínek. Stanovuje se buď množství RNA (*Northern blot*) (Busche *et al.*, 2012), nebo množství proteinů (*Western blot*). Další metodou je použití radioaktivně značených protilátek, které se vážou na určitý protein, a detekuje se síla radioaktivního signálu. Pokud gen kóduje enzym, lze stanovit enzymovou aktivitu. V případě genu kódujícího fluorescenční protein se zjišťuje hladina genové exprese intenzitou fluorescence (Kang *et al.*, 2014). V této práci se zaměřuji na zkoumání míry exprese měřením intenzity fluorescence reportérového proteinu Gfpuv.

3.2.1 Promotory

Zahájení transkripce je hlavním krokem genové exprese u bakterií, při němž dochází k její regulaci. Před každým genem (*upstream*) je přítomen významný úsek DNA, označovaný jako promotor genu, který je důležitý pro regulaci iniciace transkripce. Promotor se skládá ze dvou hlavních oblastí -10 a -35 (čísla značí počet párů bází od transkripčního počátku TSP v pozici +1). Promotor je klíčová oblast pro vazbu RNA polymerasy prostřednictvím její podjednotky sigma (faktoru σ) a pro řízení procesu transkripce. Proto má studium promotorů zásadní význam pro pochopení regulačních mechanismů genové exprese v každém organismu.

Četnost iniciace transkripce genu (síla promotoru) je podmíněna afinitou RNA polymerasy k promotorové oblasti. U modelové a nejprozkoumanější bakterie *Escherichia coli* byly statistickými analýzami a mutačními studiemi stanoveny

optimální konvenční (*konsensus*) sekvence promotorů vegetativních genů závislých na faktoru σ^{70} RNA polymerasy, k nimž má σ^{70} nejvyšší afinitu. Pro oblast -35 jde o hexamer nukleotidů 5'-TTGACA-3' a v oblasti -10 se jedná o sekvenci nukleotidů 5'-TATAAT-3'. Alternativní faktory σ rozpoznávají jiné specifické konvenční sekvence (Ring *et al.*, 1996).

3.2.1.1 Promotory *C. glutamicum*

Nalezení promotorů a určení jejich sekvence se uskutečnilo zároveň při hledání a popisování organizace genů v genomu *C. glutamicum* a při zjišťování regulačních mechanismů genové exprese. Výzkum promotorů, které byly zpočátku náhodně vybírány z genomu *C. glutamicum* a klonovány nejčastěji spolu s geny pro syntézu aminokyselin, poskytl celkem 33 promotorových sekvencí, které objasnily základní znaky předpokládaných promotorů vegetativních genů (Pátek *et al.*, 1996). Promotorové sekvence vegetativních genů u *C. glutamicum* byly stanoveny na základě transkripčních počátků (TSP) genů, které byly exprimovány v exponenciální fázi růstu. Uspořádání nukleotidů této promotorové sekvence (konvenční neboli konsensus sekvence) se podobá promotorům, které byly vymezeny jako promotory závislé na vegetativním faktoru σ^{70} u modelové bakterie *E. coli* (Pátek a Nešvera, 2011).

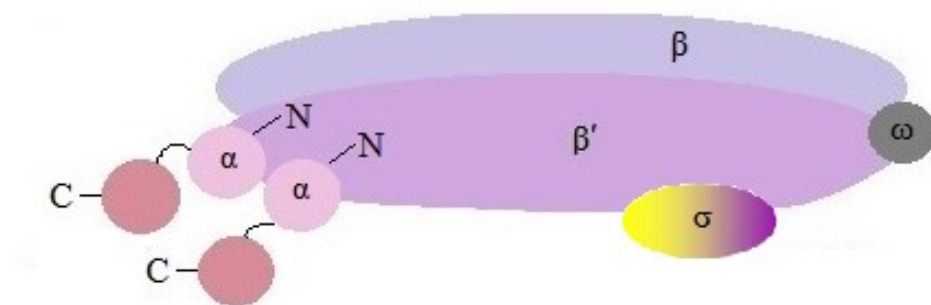
Studium mutací v klíčových sekvencích promotorů *C. glutamicum* (hexamery -35 a -10) umožnilo popis a rozbor obecných sekvenčních vzorců promotorů (Vašicová *et al.*, 1999) a mutacemi v těchto sekvencích promotorů byla pozměněna exprese genů u průmyslově užitečných bakteriálních kmenů *C. glutamicum* (Holátko *et al.*, 2009).

Byly také prostudovány geny přepisované z více promotorů závislých na různých faktorech σ (Hänssler *et al.*, 2009), a to zejména u genů, které se podílejí na stresové odpovědi (Engels *et al.*, 2004). Komplex kontrolních mechanismů genové exprese z promotorů rozpoznávaných různými faktory σ a regulovaných rozdílnými DNA-vazebnými proteiny je ovlivněn účinky vnějších vlivů, které nastavují expresní profily genů podle požadavků při změnách okolního prostředí a podle fyziologických podmínek v buněčném prostředí (Barreiro *et al.*, 2004).

Jevy, jako transkripce ze dvou nebo více promotorů, závislost na různých faktorech σ nebo překrývající se promotory závislé na jednom faktoru σ mohou být určitou regulační strategií u bakterií.

3.2.2 RNA polymerasa

Enzymem, který katalyzuje proces transkripce u bakterií, je holoenzym RNA polymerasy (Ebright, 2000). Tato kapitola se zabývá bakteriální RNA polymerasou, která je nejprozkoumanější u bakterie *E. coli*. Tento mnohapednostkový enzym se skládá z dimeru podjednotek α a dále z podjednotek β a β' , ω a σ (Obr. 1). Enzymový komplex je zodpovědný za rozpoznání promotorové sekvence a syntézu RNA.



Obr. 1: Holoenzym bakteriální RNA polymerasy.

Enzymový komplex je propojen přes podjednotku β' , na kterou jsou navázány obě podjednotky α , svou N-koncovou doménou proteinu a dále podjednotky β , ω a σ (upraveno podle Ruff *et al.*, 2015).

Dvojice podjednotek α , kódované genem *rpoA*, se podílí na formování jádra pentamerního komplexu RNA polymerasy (Zhang *et al.*, 1999) a C-koncová doména podjednotky se podílí na vazbě se specifickým úsekem DNA (UP-elementem) před promotorovou oblastí (*upstream*) (Obr.3) (Ross *et al.*, 1993). Součástí jádra komplexu je také podjednotka β , kódovaná genem *rpoB*, která obsahuje vazebné místo pro ribonukleotidtrifosfáty. Další podjednotka jádra enzymu β' , na kterou se vážou podjednotky α a σ , je kódována genem *rpoC* (Zhang *et al.*, 1999). Pro začlenění podjednotky β' do jádra enzymu slouží podjednotka ω , kódovaná genem *rpoZ* (Mathew a Chatterji, 2006).

Zásadní složkou RNA polymerasy je podjednotka σ (faktor σ), která má rozhodující roli pro zahájení transkripce. Díky této podjednotce získává RNA polymerasa specifickou afinitu pro vazbu na DNA. Po začlenění do katalytického jádra RNA polymerasy se podjednotka σ podílí na rozpoznání odpovídající promotorové sekvence DNA a správném nasednutí RNA polymerasy. Každá bakterie kóduje esenciální (primární) podjednotku σ , která je zodpovědná za rozpoznání promotorů vegetativních (*housekeeping*) genů a jejich přepis

v exponenciální fázi růstu a v převážné většině též několik alternativních podjednotek σ , přičemž se jejich počet mezi bakteriálními druhy liší (viz kapitola 3.3).

3.3 Faktory σ RNA polymerasy

Bakteriální genom kóduje jeden základní esenciální (primární) faktor σ , který zajišťuje transkripci vegetativních genů v exponenciální fázi růstu. Dále se u bakterií vyskytují alternativní faktory σ , které svou funkci uplatňují především ve stacionární fázi růstu a při náhlých změnách podmínek v intracelulárním i extracelulárním prostředí, kdy dochází ke stresovým situacím působením různých stimulů na buňku (Hermann, 2002). Faktory σ jsou označovány jako globální regulátory transkripce, protože ovlivňují expresi velkých skupin genů (regulonů).

Různé druhy bakterií obsahují odlišný počet faktorů σ . Většinou se vyskytuje více faktorů σ u bakteriálních druhů se složitějším metabolismem, u patogenů nebo u druhů se schopností sporulačního cyklu (Woods *et al.*, 2016).

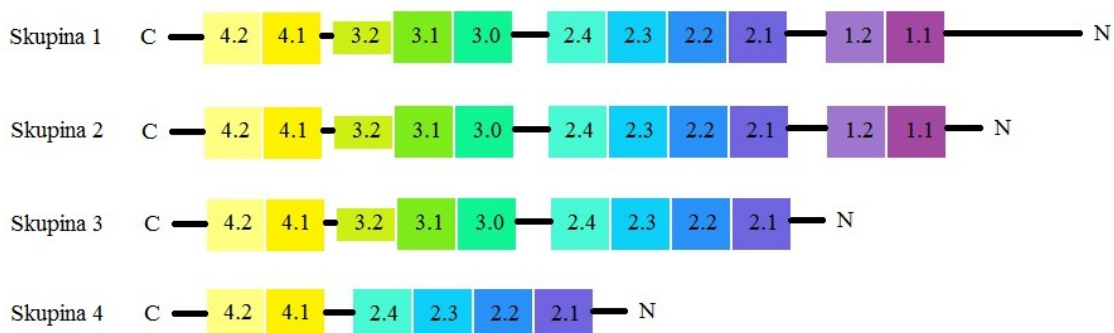
Vlivem stimulů z prostředí dochází k uvolnění faktoru σ , který byl doposud začleněn do jádra RNA polymerasy, a k jeho nahrazení jiným faktorem σ , jehož exprese a aktivita je zvyšována působením změn okolního prostředí (Mauri a Klumpp, 2014). Tímto regulačním mechanismem je ukončena syntéza nepotřebných produktů a je zajištěna exprese genů, které jsou za dané situace žádoucí (Farewell *et al.*, 1996).

Funkce některých faktorů σ je posttranslačně regulována proteinovým inhibitorem (faktorem anti-sigma). Inhibice faktoru σ je zajištěna přímou interakcí s faktorem anti-sigma (Hermann, 1999), který svou vazbou mění konformaci RNA polymerasy nebo znemožňuje připojení faktoru σ do jádra RNA polymerasy. Interakce tohoto antagonisty je reverzibilní a neaktivní stav je udržován, dokud nedojde ke stresové situaci vlivem působení okolních stimulů. Poté dochází například ke spuštění proteolytických procesů, které nejprve uvolní faktor anti-sigma z této vazby a poté jej degradují. Aktivace faktoru σ je tímto mechanismem urychlena a buňka je schopna se vyrovnat se stresem okamžitě, protože není třeba daný faktor σ nově syntetizovat.

Faktory σ se rozdělují do dvou rodin σ^{70} a σ^{54} (číselné označení je podle molekulové hmotnosti hlavních zástupců u *E. coli*) na základě jejich struktury a funkce (Gruber a Gross, 2003).

3.3.1 Faktory z rodiny σ^{70}

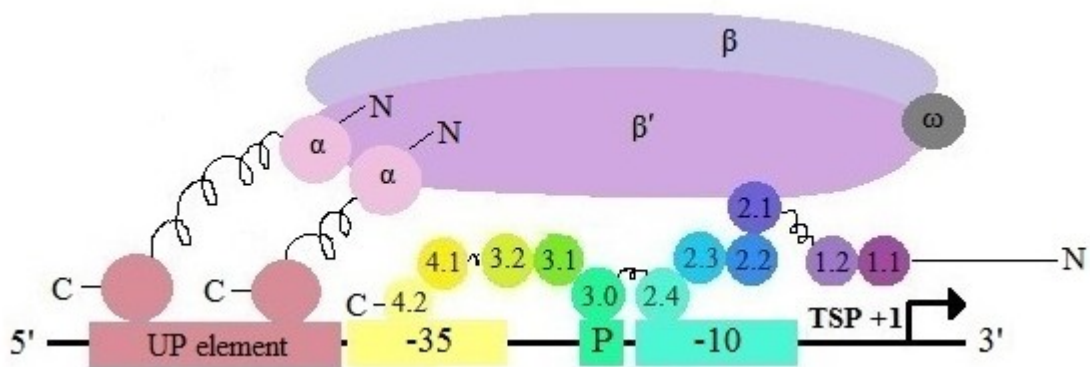
Většina faktorů σ se řadí do rodiny σ^{70} . Zástupci této rodiny se dále člení na čtyři skupiny podle obsahu domén v jejich proteinové struktuře (Obr. 2). Jednotlivé části domén specificky interagují s promotorovými oblastmi -35 a -10 (Obr. 3).



Obr. 2: Schéma struktury domén faktorů σ z rodiny σ^{70} *E. coli*.

První skupina faktorů rodiny σ^{70} obsahuje nejdelší N-koncovou doménu proteinu a čtyři domény, rozdělené na poddomény. Druhá skupina má zkrácenou N-koncovou doménu proteinu, třetí skupina postrádá celou doménu 1 a u čtvrté skupiny se objevuje pouze doména 2 a 4 (upraveno podle Gruber a Gross, 2003; Rodrigue *et al.*, 2006).

Skupina 1 zahrnuje vegetativní (primární) faktor σ a jeho proteinová struktura obsahuje všechny čtyři domény. Do skupiny 2 patří faktory σ s podobnou funkcí jako vegetativní faktor σ , jehož nahrazují zejména ve stacionární fázi růstu. U této skupiny je N-koncová doména proteinu zkrácená, na rozdíl od skupiny 1. Skupina 3 postrádá jednu doménu na N-konci proteinu a faktory σ , které se řadí do této skupiny, zajišťují u některých bakterií expresi genů pro sporulaci, flagelární systém a jiné specifické zvýhodňující funkce. Do poslední skupiny 4 náleží faktory σ , které jsou zapojeny do buněčné odpovědi na vnější stres (označeny ECF – faktory s extracytoplasmatickou funkcí) a jejich proteinová struktura obsahuje pouze dvě domény (Rodrigue *et al.*, 2006).



Obr. 3: Schéma vazby RNA polymerasy na specifické promotorové oblasti sekvence DNA prostřednictvím faktoru σ první skupiny.

C-koncová doména proteinu podjednotky α se váže na UP-element, čtvrtá doména podjednotky (4.2 - žlutá) rozpoznává -35 oblast promotoru, třetí doména σ podjednotky (3.0 – tyrkysová) se váže na prodlouženou oblast -10 (P) a druhá doména této podjednotky (2.4 – světle modrá) rozpoznává -10 oblast promotoru. Zahnutá šipka označuje směr transkripce od + 1 nukleotidu počátku transkripce (TSP) (upraveno podle Ruff *et al.*, 2015).

3.3.2 Faktory z rodiny σ^{54}

Výskyt faktorů σ z této rodiny je u bakterií poměrně vzácný. Jeden zástupce je přítomen u modelové bakterie *Bacillus subtilis*, u které byl také podrobněji studován. Oproti faktorům σ^{70} se váže na promotor zcela odlišným způsobem a v jiné oblasti (-12 a -24 od transkripčního počátku) (Buck *et al.*, 2000). Je závislý na transkripčním aktivátoru, který pro svou funkci vyžaduje ATP, a poté je schopen zahájit proces transkripce (Weiss *et al.*, 1991).

3.4 Faktory σ RNA polymerasy v *C. glutamicum*

Genom *C. glutamicum* kóduje celkem sedm faktorů σ z rodiny σ^{70} , přičemž hlavním faktorem je σ^A (kódovaný genem *sigA*) patřící do skupiny 1. Faktor σ^B (*sigB*) se řadí do skupiny 2 a ostatní faktory, σ^C (*sigC*), σ^D (*sigD*), σ^E (*sigE*), σ^H (*sigH*) a σ^M (*sigM*), náleží do skupiny 4 (Pátek a Nešvera, 2011).

3.4.1 Faktor σ^A

Hlavní faktor σ^A zajišťuje životaschopnost buňky, jelikož transkripce vegetativních genů nezbytných pro růst, rozmnožování a základní metabolismus je zahajována ze σ^A -závislých promotorů (Oguiza *et al.*, 1997). Jeho aktivita se projevuje zejména v exponenciální fázi růstu a exprese genu pro tento faktor σ se snižuje

při přechodu do stacionární fáze růstu (Larisch *et al.*, 2007). Promotory, závislé na faktoru σ^A v exponenciální fázi růstu, není možné přímo určit metodou inaktivace genu *sigA*, protože vyřazení hlavního faktoru σ je pro buňku letální (Pátek a Nešvera, 2011).

Sekvenováním transkriptomu *C. glutamicum* byly definovány konvenční sekvence promotorů rozpoznávaných σ^A (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013), které se podobají konvenčním sekvencím hlavního faktoru σ u *E.coli* (Browning *et al.*, 2004). Analýzou více než 2000 promotorů byla pro oblast -10 určena sekvence TAnnnT (“n“ představuje libovolný nukleotid v dané pozici) a pro oblast -35 byla stanovena sekvence ttgnc (malá písmena znázorňují výskyt daného nukleotidu ve 40-70 % případů) (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

3.4.2 Faktor σ^B

Úloha neesenciálního faktoru σ^B je zčásti podobá úloze faktoru σ^A , jelikož se projevuje i během exponenciální fáze růstu. Konvenční sekvence promotorů, rozpoznávaných těmito dvěma faktory σ , jsou si velice podobné, a tudíž mnoho vegetativních genů je přepisováno i působením σ^B (Oguiza *et al.*, 1997). Podstatnější úlohu zastává σ^B především v průběhu přechodu z exponenciální do stacionární fáze růstu (Larisch *et al.*, 2007), kdy je jeho aktivita ovlivňována různými stresovými vlivy. Exprese genu *sigB* je zvyšována zejména účinkem chemických vlivů např. ethanolu, různými solemi nebo kyselinami, ale i působením fyzikálních vlivů, zvláště při velkých výkyvech teplot a také dostupností kyslíku (Halgasová *et al.*, 2002). Za těchto okolností dochází k expresi genu *sigB* ze σ^H -závislého promotoru (Ehira *et al.*, 2009).

Geny, které jsou přepisovány z promotorů závislých na σ^B , byly odhaleny metodou DNA *microarray* při celkové analýze genové exprese v *C. glutamicum* WT a v kmeni bez *sigB* (*sigB* deficientní). Mezi tyto geny, které měly zesílenou expresi v přechodné fázi růstu, patří geny ovlivňující metabolismus aminokyselin a jejich transport, dále geny pro obranu vůči stresu a také geny působící na membránové a regulační procesy (Larisch *et al.*, 2007).

3.4.3 Faktor σ^C

Bakterie *C. glutamicum* je aerobní organismus, tudíž reaguje na změny v dostupnosti kyslíku. Obzvláště průmyslové kmeny, používané pro výrobu aminokyselin, vyžadují velké množství kyslíku (Ikeda *et al.*, 2009). Stresový faktor σ^C se zúčastňuje exprese genů právě při nedostatku kyslíku např. ve stacionární fázi růstu, kdy je snižena dostupnost kyslíku z důvodu zvyšování hustoty buněk.

Promotorové sekvence závislé na σ^C , jejichž konvenční sekvence byly stanoveny pro oblast -35 GGAACT a pro oblast -10 CGACNN, byly nalezeny před geny kódujícími proteiny respiračního řetězce např. cytochrom bd nebo synthasu hemu. Zvýšená exprese genu *sigC* byla také zjištěna při snížení přenosu elektronů přes cytochrom aa₃ (Toyoda a Inui, 2016).

3.4.4 Faktor σ^D

Faktor σ^D se podílí na transkripci genů účastnících se adaptace na mikroaerobní prostředí. Při nedostatku kyslíku dochází k aktivaci mechanismů, které usnadňují přenos kyslíku do respiračního systému. Jsou to např. proteiny interagující se siderofory, chelátory železa, poskytující železo hemovým proteinům (cytochromům) nebo ferredoxiny, které obstarávají přenos elektronů (Ikeda *et al.*, 2009).

Konvenční sekvence σ^D -závislých promotorů prozatím nebyly stanoveny.

3.4.5 Faktor σ^E

Faktor σ^E je zařazen mezi faktory typu ECF, jelikož se podílí na transkripci genů, které podporují adaptaci buňky na stresové podněty působící z vnějšího prostředí. Uplatňuje se v reakci na povrchový stres, oxidativní či tepelné změny, ale za normálních podmínek se v průběhu exponenciální fáze růstu jeho aktivita v buňce neprojevuje. Účastní se exprese genů, jejichž produkty mění strukturu buněčné stěny a zabraňují tak průniku nežádoucích látek do buněčného prostředí (chrání před účinkem antibiotik penicilinu nebo vankomycinu). Aktivace tohoto faktoru σ je také indukována vysokou koncentrací nejrůznějších chemických látek. Bylo potvrzeno, že *sigE*-deficientní kmen vykazuje zvýšenou citlivost vůči EDTA, SDS či lysozymu (Park *et al.*, 2008) a jeho exprese je zesílena i v přítomnosti vyšší koncentrace kyseliny

mléčné (Jakob *et al.*, 2007) a zahajuje tedy expresi genů pro odpověď na stresové podmínky vzniklé působením těchto látek.

Funkce σ^E je posttranslačně regulována anti-sigma faktorem CseE. Geny pro faktor σ^E a anti-sigma tvoří operon, a jsou tedy přepisovány v jednom transkriptu (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Před operonem byly nalezeny tři promotory, které jsou σ^A - nebo σ^B -závislé, ale obsahuje také interní promotory před genem *cseE*, které jsou σ^E - a σ^H -závislé. Konvenční sekvence σ^E -závislého promotoru nebyla zatím popsána.

3.4.6 Faktor σ^H

Exprese genu σ^H je zvýšena na počátku stacionární fáze růstu (Kim *et al.*, 2005) a také v reakci na stimuly z vnějšího prostředí, tudíž je tento faktor zařazován do ECF skupiny faktorů σ . Projevuje se při odpovědi na tepelný a oxidační stres (Engels *et al.*, 2004) a spouští transkripci genů kódujících proteiny, které chrání před důsledky těchto stresových stavů, např. chaperony (Barreiro *et al.*, 2004). Faktor σ^H se také podílí na transkripci genů kódujících jiné faktory σ , jelikož rozpoznává promotory genů *sigB* (Ehira *et al.*, 2009) a *sigM* (Nakunst *et al.*, 2007) a σ^H -závislý promotor se nachází dokonce před genem pro vegetativní faktor σ^A (Toyoda *et al.*, 2015).

Obdobně jako u faktoru σ^E dochází i v případě σ^H k regulaci anti-sigma faktorem RshA a uspořádání genů pro faktor σ a jeho příslušný faktor anti-sigma je ve společném operonu (Busche *et al.*, 2012). Konvenční sekvence σ^H -závislých promotorů byla stanovena pro oblast -35 GGAAGA a pro oblast -10 GTTGAA (Ehira *et al.*, 2009).

3.4.7 Faktor σ^M

Dalším zástupcem faktorů σ typu ECF je σ^M a podle dosud jediné publikace o tomto faktoru σ vyvolává u *C. glutamicum* expresi genů, které chrání buňku před důsledky teplotního a oxidativního stresu (Nakunst *et al.*, 2007), např. *trxB* (thioredoxinreduktasa), *trxB1* (thioredoxin) a *trxC* (thioredoxin). V poslední době však bylo prokázáno, že transkripce těchto genů je v některých kmenech zahajována z promotoru závislého na σ^H (Pátek, nepublikováno). Žádný jiný gen, u něhož by bylo jednoznačně prokázáno, že je přepisován za účasti faktoru σ^M není dosud znám.

Byla také navržena sekvence klíčových elementů σ^M -závislých promotorů, obsahujících v oblasti -35 hexamer gGGAAT a v oblasti -10 jádro hexameru GTTG

(Nakunst *et al.*, 2007), přičemž téměř shodnou sekvenci rozpoznává i σ^H (Busche *et al.*, 2012).

Vzhledem k nejasnostem ohledně správnosti přiřazení promotorů však existují pochybnosti o této definici sekvence σ^M -závislých promotorů. Faktor σ^M byl dosud po heterologní expresi genu *sigM* v *E. coli* obtížně izolovatelný jako rozpustný protein a pokusy o prokázání σ^M -závislých promotorů pomocí transkripce *in vitro* (Holátko *et al.*, 2012) proto zatím selhaly (Pátek, ústní sdělení).

3.5 Plasmidové vektory

Vektor je specificky upravený úsek DNA, který umožňuje přenos cílového genu do hostitelského organismu. Genové manipulace hostitele prostřednictvím vektorových přenašečů jsou využívány pro různé molekulárně biologické studie, jako např. vytváření genomových knihoven, výzkum vlivu genu na fenotyp (Follettie *et al.*, 1988), analýza promotorových sekvencí nebo přímá exprese vloženého genu (Eikmanns *et al.*, 1991a; Pátek *et al.*, 1996).

Existují různé typy vektorů s odlišnou klonovací kapacitou a funkcí. Se zvětšující se velikostí plasmidového vektoru se však zhoršuje účinnost přenosu do hostitelských buněk (Parikh *et al.*, 2013). Vektory plasmidového typu jsou nejjednodušší a jsou schopny pojmout DNA o velikosti přibližně 10 kb. Jiné typy vektorů, např. odvozené od bakteriofága λ , mají dvojnásobnou klonovací kapacitu. YAC – *yeast artificial chromosome* (kvasinkové umělé chromosomy) a BAC – *bacterial artificial chromosome* (bakteriální umělé chromosomy) mohou mít klonovací kapacitu až 2 Mb. V této práci jsem používala výhradně plasmidové vektory, a proto se v literárním přehledu zaměřím pouze na ně.

Podstatnou vlastností použitého vektoru je rovněž jeho schopnost replikace v buňce příjemce, a proto každý autonomně se replikující vektor nese nejméně jeden replikační počátek (*ori*). Dále pak existují podvojně neboli kyvadlové (*shuttle*) vektory (Eikmanns *et al.*, 1991a), což je označení pro vektory, které obsahují další replikační počátek (replikon) a mohou být pomnoženy nejen v různých druzích bakterií, ale i v jiných organismech (kvasinky, lidské buňky).

Většina plasmidových vektorů se autonomně replikuje volně v cytoplasmě hostitelské buňky za pomoci replikačního aparátu hostitele (replikativní vektory). Existují však také vektory, které se v hostitelské buňce autonomně nereplikují, ale mají

schopnost začlenit se do genomu příjemce homologní rekombinací nebo integrací do specifických míst chromosomu (integrativní vektory) (Vašicová *et al.*, 1998). V případě homologní rekombinace mohou zapříčinit delecii nebo disrupci genů, avšak při integraci, např. do nekódujících oblastí nebo vícekopiových genů, neovlivňují životaschopnost rekombinantního kmene (Moreau *et al.*, 1999).

Nezbytnou součástí vektoru jsou klonovací místa, do kterých se začleňuje vkládaná DNA (insert), což jsou jedinečná restrikční místa s více možnostmi štěpení mnoha druhů restrikčních endonukleas, tzv. *polylinker* neboli mnohonásobné klonovací místo (MCS - *multiple cloning site*). Ke spojení vektoru a insertu dochází za předpokladu komplementárních konců insertu a vektoru, které jsou upraveny stejnými restrikčními enzymy. Ve vektoru je rovněž nepostradatelná přítomnost selekčního genu důležitého pro potvrzení úspěšnosti transformace hostitelské buňky vektorovou DNA. Tento gen má vliv na fenotypový projev a lze tak snadno ověřit úspěšnost klonování a současně udržet cizorodou DNA při replikaci, a tím zajistit stabilitu klonů. Nejčastěji jde o geny pro rezistenci k antibiotikům (Tauch *et al.*, 2003) nebo schopnost utilizace jiného substrátu (Tauch *et al.*, 2002).

Základními plasmidovými vektory jsou klonovací vektory, což jsou prosté vektory se schopností přijmout sekvenci cizorodé DNA různého původu, od bakteriální, přes eukaryotickou až po uměle připravenou, a následně se autonomně replikovat a namnožit DNA sekvenci v hostitelské buňce. Nejčastěji jde o kružnicovou molekulu DNA. Používají se pro izolaci velkých úseků DNA a jejich sekvenování.

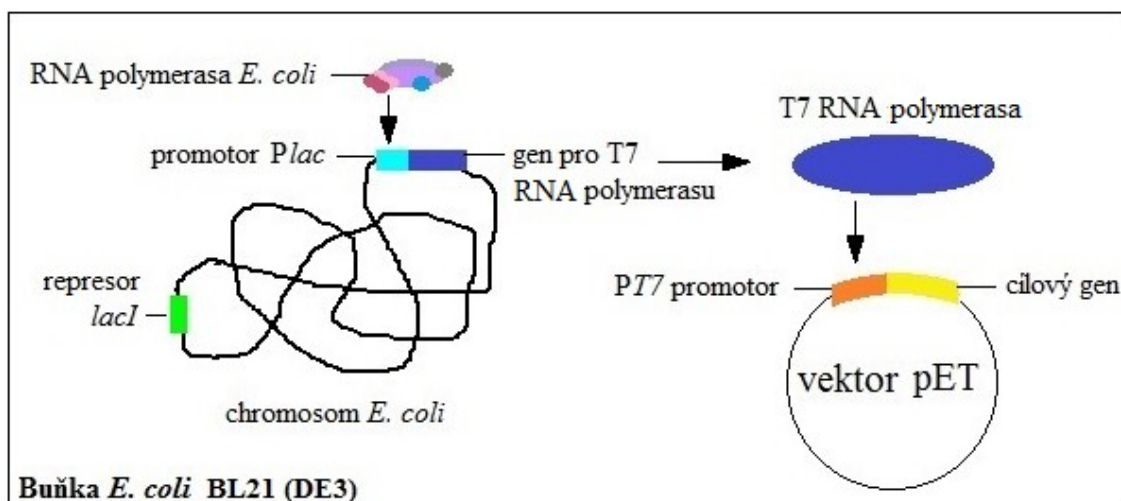
Dále se plasmidové vektory dělí na speciálně účelové vektory, mezi něž se řadí expresní vektory, které slouží jako nástroje pro regulaci nebo zvýšení exprese analyzovaných genů, a proto nesou před klonovacím místem indukovatelné promotory, jako účinný signál pro genovou expresi (Kirchner a Tauch, 2003).

Dalšími účelovými vektory jsou promotor-test vektory, které se používají pro *screening* promotorů (Schneider *et al.*, 1986) a analýzu jejich funkčních vlastností za různých podmínek buněčného růstu (Holátko *et al.*, 2009). Dobře definované promotory se používají jako stavební prvky těchto vektorů a umožňují řízení exprese vybraných genů. Podrobně se budu jednotlivým vektorům *C. glutamicum* věnovat v dalších kapitolách.

3.5.1 Expresní vektory

Expresní vektor je plasmid složený z několika základních sekvencí důležitých pro integraci insertu cílového genu, selekci bakteriálního klonu a expresi proteinu. Insert je lineární molekula DNA se specificky upravenými konci pomocí restrikčních enzymů, což umožní jejich vložení do kompatibilních míst expresního vektoru. Zásadní součástí expresního vektoru je silný regulovatelný promotor, ze kterého je exprese vkládaného genu zahajována a který se nachází před (*upstream*) klonovacím místem. V expresním vektoru bývá přítomen také terminátor transkripce. U bakteriálních expresních vektorů je navíc nezbytná sekvence Shine-Dalgarno pro následnou translaci mRNA a syntézu proteinu (Moll *et al.*, 2002). Expresní vektory přispívají k efektivnějšímu přepisu vložené sekvence DNA do mRNA a především následně zprostředkovávají vysoký výťažek proteinů v hostitelské buňce (*over-exprese*). Expresní vektor je v hostiteli namnožen, přičemž množství produkovaného proteinu závisí i na počtu kopií plasmidu, kterých je schopen v buňce vytvořit (tzv. efekt genové dávky) (Ito *et al.*, 1990a).

Expresní vektory se používají jak pro regulovanou expresi homologních genů pocházejících z hostitele, tak pro expresi heterologních genů původem z jiného organismu. Nejčastěji využívanými expresními vektory jsou vektory série pET (např. pET22, pET28), nesoucí silný promotor *PT7* (Chamberlin a Ring, 1973). Tyto vektory jsou vkládány do speciálního kmene *E. coli* BL21 (DE3) (Jeong *et al.*, 2009), jehož genom nese gen pro T7 RNA polymerasu pocházející z bakteriofága T7 (Tabor a Richardson, 1985), která umožňuje transkripci z promotoru *PT7* (Obr. 4). Tato RNA polymerasa je v expresních systémech využívána pro svou stabilitu, díky čemuž je transkripce genu účinnější. Gen *T7* kódující RNA polymerasu je řízen promotorem *Plac*, který je v nepřítomnosti induktoru IPTG inhibován jeho přirozeným represorem *lacI* (Dubendorff a Studier, 1991). Exprese genu *T7* je řízeně indukována, čímž je regulována i exprese genů pod kontrolou promotoru *PT7* (Studier a Moffatt, 1986).



Obr. 4: Schématické znázornění funkce T7 expresního systému.

Po indukci IPTG zahajuje RNA polymerasa *E. coli* transkripci z promotoru *Plac* přítomného na chromosomu *E. coli* BL21 (DE3), který řídí expresi genu T7 RNA polymerasy. Tato polymerasa je poté syntetizována a nasedá na promotor PT7, který nese vektor pET, a následně dochází k expresi cílového genu.

3.5.2 Vektory *C. glutamicum*

Objev přirozených plasmidů u *C. glutamicum* umožnil konstrukci zejména klonovacích kyvadlových vektorů pro tuto bakterii (Santamaría *et al.*, 1984). Tyto vektory byly použity pro genetickou analýzu *C. glutamicum* a získaly uplatnění také při genové manipulaci pro praktické použití této bakterie v biotechnologických procesech. Za účelem zvýšení produkce aminokyselin byly vytvořeny expresní vektory využívané i pro zjišťování regulace genové exprese (Kirchner a Tauch, 2003).

Kryptické plasmidy (neovlivňující zjevně fenotyp hostitele) pocházející z *C. glutamicum* sloužily jako základ pro konstrukci většiny kyvadlových vektorů použitých pro klonování genů v *C. glutamicum* a *E. coli*. Jedná se například o plasmidy pBL1 (4477 bp), který má 10-30 plasmidových kopií na buňku (Santamaría *et al.*, 1984), pCG1 (3069 bp), dosahující okolo 30 kopií (Venkova-Canova *et al.*, 2003) a pGA1 (4823 bp), jehož počet se zvyšuje až na 35 kopií přičemž stabilita a udržení plasmidu v buňce je pozitivně ovlivňována počtem plasmidových kopií (Nešvera *et al.*, 1997). Ke stabilitě plasmidu přispívá také mechanismus jeho replikace (de la Campa *et al.*, 1990). U nativních plasmidů *C. glutamicum* probíhá replikace nejčastěji mechanismem valivého kruhu (*rolling circle* - RC) (del Solar *et al.*, 1998). Tento typ replikace právě podporuje vyšší stabilitu plasmidu.

Do kryptických plasmidů je vkládán selekční gen, nejčastěji pro determinaci rezistence k určitému antibiotiku. Geny rezistence na antibiotika jsou získávány jak

z velkých plasmidů *C. glutamicum*, např. pCG4 a pAG1 (Tauch *et al.*, 2000) tak z jiných bakterií. Připojení selekčního genu k plasmidovému vektoru se uskutečňuje v MCS.

Některé plasmidy jsou vzájemně nekompatibilní, a tedy není možné jejich soužití společně v jedné buňce. Pokud jsou nekompatibilní plasmidy do buňky vloženy, dochází k vyštěpování jednoho z nich a druhý nakonec úplně převládne (Edmondson a Parker, 2012). Stabilního udržování rekombinantních plasmidů v buněčných kulturách se dosahuje využitím pozitivního selekčního tlaku nebo použitím specifických mutant hostitelských kmenů a zároveň plasmidových vektorů, nesoucích geny doplňující danou mutaci. Byla provedena také studie o možnosti soužití dvou různých plasmidů v jedné hostitelské buňce, v případě, že do každého plasmidu byl klonován gen zapojený do jediné metabolické dráhy a prokázala se kompatibilita těchto biplasmidových vektorů (pBL1, pCG1) (Ito *et al.*, 1990b).

3.5.2.1 Klonovací vektory *C. glutamicum*

Mezi plasmidové klonovací vektory *C. glutamicum* patří zejména kyvadlové mnohokopiové vektory replikující se v *C. glutamicum* a *E. coli*, vektory *C. glutamicum* pro *self-cloning* a vektory integrující se do chromosomu *C. glutamicum* (Merriman a Lamont, 1992; Vašicová *et al.*, 1998).

Kyvadlové vektory jsou přítomny v buňce *C. glutamicum* v 10-50 kopiích. Klonování genů do těchto vícekopiových vektorů tak vede ke zvýšené syntéze jejich metabolitů díky vyššímu počtu genů na buňku, což získává praktický význam pro průmyslovou produkci (Ito *et al.*, 1990a; Eikmanns *et al.*, 1991b). Nicméně se zjistilo, že vysoké dávky některých klonovaných genů by mohly být škodlivé pro růst hostitelských buněk (Cremer *et al.*, 1991). Proto byly zkonstruovány i nízkokopiové vektory založené na minireplikonu plasmidu pNG2 z *C. diphtheriae* (Reinscheid *et al.*, 1994; Kirchner a Tauch, 2003).

Samoklonovací vektory, které obsahují pouze DNA z *C. glutamicum* jsou využívány pro genetické manipulace v rámci bakteriálního chromosomu. Použití těchto vektorů, bez heterologní DNA, představuje alternativu pro konstrukci stabilních a bezpečných kmenů *C. glutamicum* používaných pro průmyslové fermentace (Ikeda a Katsumata, 1998).

Narušení funkce genu nebo výměny genů v chromosomu lze dosáhnout použitím plasmidového vektoru, který podporuje začlenění klonovaného fragmentu do chromosomu. Příkladem je sebevražedný mobilizovatelný vektor pK18mobasacB, který je schopen replikace pouze v *E. coli*. Vložením genu z *C. glutamicum* do tohoto vektoru je umožněna integrace do chromosomu *C. glutamicum* na základě homologní rekombinace a následně je vektor vyštěpen. V případě vyštěpení vektoru dochází zároveň k delecí okolních sekvencí, což přispívá k tvorbě dalších mutací v genomu *C. glutamicum* (Schäfer *et al.*, 1994).

3.5.2.2 Expresní vektory *C. glutamicum*

Bakterie *C. glutamicum* je příhodný hostitel pro sekreční produkci proteinů s příznivými a dobře prozkoumanými technologickými vlastnostmi. Je tedy velmi důležité vyvinout systémy, které umožňují vložení i heterologních genů do jejího genomu. Rozvíjející se metabolické inženýrství se věnuje vytváření expresních vektorů umožňujících syntézu zejména heterologních proteinů, což přispívá ke zcela novým metabolickým schopnostem hostitelského organismu. Cílem tohoto konání je produkce průmyslově významných metabolitů (Kang *et al.*, 2014).

V případě, že jsou vytvářeny expresní systémy obsahující geny pro produkci žádoucích proteinů, je vhodné, aby tyto produkty genů byly sekretovány do extracelulárního prostoru. Jsou známy dvě hlavní sekreční dráhy pro přenos proteinů v *C. glutamicum*. Sec (*secretory*) dráha katalyzuje přesun nesbalených proteinů, které se skládají až po sekreci z cytoplasmy přes cytoplazmatickou membránu (Cheng, 2010), zatímco Tat dráha (*twin-arginin* translokace) slouží k přepravě již sbalených proteinů (Zhang *et al.*, 2015a). Při použití expresního vektoru, kódujícího histidinovou kotvu (His-tag) (Park *et al.*, 2008) nebo glutathion-S-transferasu (Srivastava a Deb, 2002) se mohou produkty klonovaných genů izolovat jako fúzní proteiny metodou afinitní chromatografie. Tato metoda je však využitelná pouze v případě, že jsou proteiny exprimovány do cytosolu. V opačném případě se hromadí v inkluzních tělíkách, což ztěžuje proces purifikace proteinu a zachování enzymové aktivity proteinu.

Zvýšená exprese klonovaných genů je důležitá pro praktické aplikace. Rozhodující faktor pro vysokoúčinnou produkci heterologních proteinů je použití expresního vektoru, který obsahuje silný promotor. Proto je žádoucí, aby exprese cílových genů, jejichž produkty jsou průmyslově využitelné, byla řízena

ze silných regulovatelných promotorů. Doposud bylo vytvořeno několik kyvadlových vektorů *E. coli*/*C. glutamicum* pro zesílenou expresi genů, např. pEKEx1 (Eikmanns *et al.*, 1991a) pVWEx1 (Peters-Wendisch *et al.*, 2001), které využívají regulovatelné promotory *Plac*, *Ptac* nebo *Ptrc* z *E. coli* (Eikmanns *et al.*, 1991a; Kirchner a Tauch, 2003). Exprese genu je řízeně zahájena až po přidání induktoru. V případě výše zmíněných promotorů je induktorem isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG). Pro zajištění přímé regulace těchto promotorů obsahují expresní vektory zároveň gen *lacI* kodující represor, který je řízen silným konstitutivním promotorem. Působení IPTG, jako silného induktoru, pak vyvazuje represor z promotorové oblasti (Lausberg *et al.*, 2012). Expresní systémy, založené na indukci genové exprese přidáním IPTG, jsou velmi užitečné pro analýzu genů v laboratorních podmínkách. Nicméně, jejich použití v průmyslovém měřítku se jeví jako velmi omezené vzhledem k vysokým nákladům na indukující sloučeniny. Prostřednictvím několika typů expresních vektorů je však *C. glutamicum* schopna vysoké produkce proteinů (Eikmanns *et al.*, 1994; Kortmann *et al.*, 2015). Induktorem mohou být i jiné látky, např. antibiotika (Lausberg *et al.*, 2012) nebo je promotor indukován stresovými situacemi, např. zvýšenou teplotou (Blokpoel *et al.*, 2005).

Exprese genů v expresních systémech *C. glutamicum* využívá obvykle vlastní RNA polymerasu. Byl ale vytvořen i speciální kmen *C. glutamicum* MB001 (DE3) (analogický kmeni *E. coli* BL21 (DE3), viz část 3.5.1), jehož genom nese gen pro T7 RNA polymerasu (Kortmann *et al.*, 2015). Pro kmen *C. glutamicum* MB001 (DE3) byl zkonstruován expresní vektor pMKEx2 obsahující silný promotor PT7, ze kterého je zahajována transkripce genů prostřednictvím stabilnější T7 polymerasy, vhodné pro dosažení vysoké produkce proteinů. Expresní vektor pMKEx2 zároveň umožňuje snadnou izolaci proteinových produktů cílových genů prostřednictvím histidinové kotvy (Kortmann *et al.*, 2015).

Expresní vektory nesoucí heterologní geny mohou pozměnit metabolismus hostitelského organismu natolik, že je schopen zpracovávat levnější a dostupnější zdroj uhlíku než na kterém byl doposud závislý, např. celobiosu nebo xylosu (Kotrba *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2006). Metabolická produkce se tak stává ekonomicky výhodnější. Tento typ vektorů byl úspěšně použit pro konstrukci rekombinantních kmenů *C. glutamicum* vykazujících zvýšenou produkci přirozených metabolitů nebo nově využívaný zdroj uhlíku, který poskytl hostiteli stavební prvky pro tvorbu jiných

užitečných metabolitů, které nebyly přirozeně produkovány kmeny *C. glutamicum* divokého typu (Barrett *et al.*, 2004).

Promotory a plasmidy bakterie *C. glutamicum* jsou molekulárním nástrojem pro studium genové exprese a významným způsobem přispívají ke zdokonalení průmyslových kmenů. Proto byly vytvořeny expresní vektory ve snaze o řízení genové exprese při produkci cílových rekombinantních proteinů (Ravasi *et al.*, 2012). Cílem je zároveň optimalizovat sílu exprese genu pro získání co nejvyššího množství kódovaného proteinu (Anthony *et al.*, 2009). Kromě vektorů zajišťujících regulovanou expresi klonovaných genů působením induktoru, představuje regulace pomocí změn teploty další vhodnou alternativu pro řízení exprese genů. Byl objeven represorový systém promotorového operátoru a gen kódující teplotně citlivý represor (Tsuchiya a Morinaga, 1988). Pro zvýšenou produkci enzymů se využívá též vektor, který poskytuje naopak konstitutivní expresi z promotoru (Liu *et al.*, 2007).

3.5.2.3 Promotor-test vektory *C. glutamicum* pro studium regulace exprese genů

Specifickými vektory jsou promotor-test vektory využívající bezpromotorové reportérové geny, před něž (*upstream*) se klonují testované promotory a dochází tak k transkripční fúzi (Barák *et al.*, 1990). Tyto vektory slouží pro testování aktivity promotorů, a tedy pro charakterizaci promotorové oblasti určitého genu. Prostřednictvím promotor-test vektorů je možné studovat taktéž regulaci aktivity promotorů (Eikmanns *et al.*, 1991a).

Pro konstrukci promotor-test vektorů se používají bezpromotorové reportérové geny, jejichž produkty lze snadno detekovat a kvantifikovat i množství reportérového proteinu. Reportérové geny kódují zejména různé enzymy, které jsou v *C. glutamicum* aktivní, např. *lacZ* kódující β -galaktosidasu z *E. coli* (Eikmanns *et al.*, 1991a) nebo fluorescenční proteiny GFP (*green fluorescent protein* z medúzy *Aequorea victoria*), RFP (*red fluorescent protein* z korálu *Discosoma sp.*) či YFP (*yellow fluorescent protein* z medúzy *Aequorea victoria*). Použitím reportérových genů kódujících fluorescenční protein můžeme zjistit promotorovou aktivitu podle intenzity fluorescence i v živých buňkách (*in vivo*) (Knoppová *et al.*, 2007).

V Laboratoři molekulární genetiky bakterií MBÚ AV ČR, v. v. i. byly vyvinuty promotor-test vektory pET2, pEPR1 a pRAG5. Vektor pET2 nese reportérový gen *cat*, který koduje enzym chloramfenikolacetyltransferasu (Vašicová *et al.*, 1998). Tento

vektor byl použit pro analýzu transkripční regulace různých genů a operonů v *C. glutamicum*. Další příkladem těchto vektorů je pEPR1 nesoucí reportérový gen *gfpuv* kódující zelený fluorescenční protein nebo jeho derivát, vektor pRAG5, který navíc nese gen *rfp* kódující červený fluorescenční protein. Oba geny jsou v *C. glutamicum* řízeny silným konstitutivním promotorem (Knoppová *et al.*, 2007).

Promotor-test vektory se osvědčily jako užitečné nástroje pro analýzu promotorové aktivity. Byly odhaleny promotory rozpoznávané RNAP s alternativními faktory σ a určeny konvenční sekvence těchto specifických tříd promotorů. Při studiu promotorů se dosáhlo významného pokroku, jelikož byl lokalizován vysoký počet promotorů a byla zároveň odhalena jejich struktura. Tento pokrok posloužil mimo jiné k pochopení regulačních mechanismů v *C. glutamicum*. (Pátek a Nešvera, 2011; Busche *et al.*, 2012)

Promotor-test vektory lze využít v biplasmidových systémech, kde expresní vektor zajišťuje nadprodukcí jednoho faktoru sigma a je měřena reakce reportérového genu promotor-test vektoru, který obsahuje testovaný promotor. Tímto způsobem jsou přiřazovány sigma faktory ke konkrétním promotorům (Rezuchova a Kormanec, 2001).

4 Materiál a metody

4.1 Přístrojové vybavení

Tab. 1: Použité přístroje.

Název	Výrobce
Analytická váha GR-202 EC	A&D Company, Japonsko
Autokláv CertoClav CV EL s termostatem	CertoClav Sterilizer, Rakousko
Centrifuga Avanti® J-26 XPI (rotor JA-25.50)	Beckman Coulter, USA
Digitální fotoaparát KODAK DC290 Zoom	KODAK, USA
Elektroforetická aparatura	ATTO, Japonsko
Elektroporátor Gene Pulser	Bio-Rad, Německo
Evaporátor Savant™ DNA 120 (SpeedVac)	Thermo Fisher Scientific, USA
FastPrep®-24 Classic Instrument	MP Biomedicals, USA
Fluorimetr Safire²	Tecan, Rakousko
Chlazená centrifuga – Eppendorf 5804	Eppendorf, Německo
Chlazená centrifuga Mikro 200R	Hettich, Německo
Kývačka MR-01	Biosan, Litva
Laboratorní váhy	Sartorius, Německo
Magnetická míchačka Mini MR Standard	IKA, Německo
Mikrocentrifuga	Roth, Korea
pH metr PHM210 Standard	Radiometer Analytical SAS, Francie
Průtokový cytometr BD LSR II	Becton, Dickinson and Company, USA
Rotátor Trayster basic	IKA, Německo
Sonikátor UW-2200	Bandelin, Německo
Spektrofotometr Biomate 5 Double Beam UV/VIS	Thermo Electron Corporation, USA
Spektrofotometr NanoPhotometer UV/VIS	IMPLEN, Německo
Spektrofotometr Ultrospec 10	Biochrom, UK
Tgradient ThermoBlock	Biometra, Německo
Termoblok s mícháním Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
Termoblok Thermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Německo
Transiluminátor TMW-20 White/UV	Sigma-Aldrich, USA
Transiluminátor UVT-20 M	Herolab, Německo
Třepačka Gallenkamp10x400	Gallenkamp, UK
Třepačka Orbital Shaker Incubator ES-20	Biosan, Litva
Vortex GVLab	Gilson, Německo
Zdroj napětí pro elektroforézu Consort E844	Consort, Belgie

4.2 Software

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) – analýza a porovnávání sekvencí

KODAK 1D *Image Software* – vizualizace a úprava elektroforetogramů DNA

pDRAW32 1.1.0.131 (<http://www.acaclone.com>) – zpracování nukleotidových sekvencí

Microsoft Malování, MS Windows 10 – grafické úpravy

Microsoft Office 2007 *Professional Edition* – úprava textu, tabulek a grafů

4.3 Chemikálie

Agar – Oxoid, UK

Agarosa SeaKem[®] LE – Lonza, USA

Akrylamid – VWR, ČR

Ampicilin – Serva, Německo

Antifoam 204 – Sigma-Aldrich, USA

Biotin – Biotium, USA

Bovine serum albumin (BSA) – Sigma-Aldrich, USA

Bromfenolová modř – Serva, Německo

Citronan sodný – Penta, ČR

Color Protein Standard, Broad Range – New England BioLabs, USA

Coomassie Brilliant blue G-250 – Serva, Německo

CutSmart[®] Buffer – New England BioLabs, USA

D-Sorbitol – Serva, Německo

dNTP – TopBio, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) – Lachema, ČR

Dodecylsírán sodný (SDS) – Sigma-Aldrich, USA

Ethanol 96% – Lachema, ČR

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma-Aldrich, USA

Fenol – Serva, Německo

Fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) – Serva, Německo

Gel Loading Dye Blue – New England BioLabs, USA

GelRed – Biotium, USA

GeneRuler Plus 1 kb DNA ladder, 100 bp DNA ladder – Fermentas, USA

Glukosa – Lach-Ner, ČR

Glycerol – VWR, ČR

Glycin – Lach-Ner, ČR

GoTaq[®] DNA polymerasa – Promega, USA

Green GoTaq[®] Reaction Buffer – Promega, USA

Heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄·7H₂O) – Lachema, ČR

Heptahydrát síranu zinečnatého (ZnSO₄·7H₂O) – Lach-Ner, ČR

Hexahydrát síranu nikelnatého (NiSO₄·6H₂O) – Penta, ČR

Hexahydrát síranu železnatého (FeSO₄·6H₂O) – Penta, ČR

Hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4) – Lachema, ČR
 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4) – Lachema, ČR
 Hydroxid draselný (KOH) – Lachema, ČR
 Hydroxid sodný (NaOH) – Lach-Ner, ČR
 Chlorid manganatý (MnCl_2) – Lachema, ČR
 Chlorid rubidný (RbCl) – Sigma-Aldrich, USA
 Chlorid sodný (NaCl) – Lach-Ner, ČR
 Chlorid vápenatý ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – Lachema, ČR
 Chloroform – Penta, ČR
 Imidazol – Sigma-Aldrich, USA
 Isoamylalkohol – Penta, ČR
 Izopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) – Sigma-Aldrich, USA
 Kanamycin – Sigma-Aldrich, USA
 Kvasinkový extrakt – Serva, Německo
 Kyselina fosforečná (H_3PO_4) – Lach-Ner, ČR
 Kyselina octová – Penta, ČR
 Kyselina protokatechová – Sigma-Aldrich, USA
 Lysozym – Serva, Německo
 Methanol – Lach-Ner, ČR
 Močovina – Lachema, ČR
 NEBuffer 3.1 – New England BioLabs, USA
 NuPAGE LDS Sample Buffer 4x – Invitrogen, USA
 Octan draselný – Sigma-Aldrich, USA
 Pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – Penta, ČR
 Peroxodisíran amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) – Serva, Německo
 Polyakrylamid – Serva, Německo
 Polyethylenglykol – Thermo Fisher Scientific, USA
 Restrikční endonukleasy (*AvrII*, *EcoRI*, *NcoI*, *PstI*, *XhoI*) – New England BioLabs, USA
 Síran amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) – Sigma-Aldrich, USA
 Síran manganatý (MnSO_4) – Penta, ČR
 Spektinomycin – Applichem, Německo
 TALON[®] Metal Affinity Resin – Clontech, USA
 Tetracyklin – Serva, Německo
 Tetramethyletylendiamin (TEMED) – Sigma-Aldrich, USA
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Serva, Německo
 Trypton – Oxoid, UK
 T4 DNA ligasa – New England BioLabs, USA
 2-merkptoethanol – Sigma-Aldrich, USA
 3-(N-morpholino)propanosulfonová kyselina (MOPS) – Serva, Německo

4.4 Pufry

- **Pufr P**

Glycerol 5% (v/v)

NaCl 300 mM

Na₂HPO₄ 50 mM

(pH = 8 – upraveno HCl)

po sterilizaci přidáno:

PMSF 0,1 mM

(0,1 M fenylmethylsulfonyl fluorid v 96% (v/v) EtOH)

2-merkaptoethanol 3 mM

- **Pufr PBS**

KCl 3 mM

KH₂PO₄ 1,7 mM

NaCl 138 mM

Na₂HPO₄ 2,7 mM

pH = 8 – upraveno H₃PO₄

po sterilizaci přidáno:

PMSF 0,1 M

(0,1 M fenylmethylsulfonyl fluorid v 96% (v/v) EtOH)

4.5 Kultivační média

(antibiotika přidávána po sterilizaci a zchladnutí kultivačního média)

- **Pevné komplexní médium 2xYT (1 l) (Sambrook *et al.*, 2001)**

NaCl 5 g

Trypton 16 g

Yeast extract 10 g

Agar 15 g

(pH = 7 – neupravováno)

- **Tekuté komplexní médium 2xYT (1 l) (Sambrook *et al.*, 2001)**

NaCl 5 g

Trypton 16 g

Yeast extract 10 g

(pH = 7 – neupravováno)

- **Tekuté minimální médium CGXII (1 l) (Keilhauer *et al.*, 1993)**

(pro *C. glutamicum*)

KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Močovina	5 g
MOPS	42 g
<u>(NH₄)₂SO₄</u>	<u>20 g</u>

(pH = 7 – upraveno NaOH)

po sterilizaci přidáno:

Biotin (0,2 mg/ml)	1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (1 g/100 ml)	1 ml
Glukosa (50% w/v)	80 ml
Kyselina protokatechová	1 ml
30 g/ml, 1N NaOH do 10 ml (sterilizováno filtrací)	
Stopové prvky CG	1 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02 g
FeSO ₄ ·6H ₂ O	1 g
MnSO ₄	1 g
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g

- **Tekuté médium NCM (1 l) (Ruan *et al.*, 2015)**

(pro vysokoúčinnou transformaci *C. glutamicum*)

Citronan sodný	0,3 g
K ₂ HPO ₄	17,4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
NaCl	11,6 g
Sorbitol	91,1 g
Trypton	5 g
Yeast extract	1 g

po sterilizaci přidáno:

Glukosa (50% w/v)	5 ml
<u>Glycin (2,5 M).....</u>	<u>160 ml (sterilizováno filtrací)</u>

(pH = 7,2 – upraveno HCl)

4.6 Komerční soupravy

EnPresso[®] B (Sigma-Aldrich, USA)

NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel, Německo)

NucleoSpin[®] Plasmid (Machery-Nagel, Německo)

NucleoBond[®] Xtra Midi (Machery-Nagel, Německo)

4.7 Oligonukleotidové primery

SIGMPMKEX2F – 5'-TACCCATGGCCGTACTGCCTAAAAAC-3'

SIGMPMKEX2R – 5'-AGCCCTAGGTCAGTGGTGGTGGT-3'

T7TP – 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

SIGM – 5'-GTCGACCTCGGCGGCTACA-3'

4.8 Bakteriální kmeny

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 – typový kmen (Kinoshita *et al.*, 1958)

Corynebacterium glutamicum MB001 (DE3) – gen pro T7 polymerasu kódován v chromosomu a jeho exprese řízena promotorem *Plac* indukovaným IPTG, represor *lacI* (Kortmann *et al.*, 2015)

Escherichia coli DH5a – kmen umožňující α -komplementaci β -galaktosidasy (Hanahan, 1985)

4.9 Plasmidy

pCLTON1 – *E. coli/C. glutamicum* kyvadlový vektor, *ori*_{C.g.} pBL1, *ori*_{E.c.} pUC18, promotor *Ptet* odvozen z pWH105 *B. subtilis*, indukce tetracyklinem (Tc), represor *tetR*, rezistence ke kanamycinu (Km), 7939 bp (Lausberg *et al.*, 2012)

pCLTON1-*gfpuv* – pCLTON1 obsahující gen *gfpuv*, 8637 bp (Lausberg *et al.*, 2012)

pEC-XT99A – *E. coli/C. glutamicum* kyvadlový vektor, *ori*_{C.g.} pGA1, *ori*_{E.c.} pUC18, promotor *Ptrc*, indukce IPTG, represor *lacI*, rezistence k tetracyklinu (Tc), 7509 bp (Kirchner a Tauch, 2003)

pEC-XT99A-*gfpuv* – pEC-XT99A obsahující gen *gfpuv*, 8325 bp (Eggeling, nepublikováno)

pEC-XT99A- σ – pEC-XT99A alternativně obsahující gen pro faktor σ : **-sigC** – 8119 bp (Rucká, nepublikováno); **-sigD** – 8093 bp (Dostálová, nepublikováno); **-sigE** – 8250 bp, **-sigH** – 8174 bp a **-sigM** – 8259 bp (Lukavská, nepublikováno)

pEKEx3 – *E. coli*/*C. glutamicum* kyvadlový vektor zkonstruovaný z vektoru pEK0, *ori_{C.g.}*, pBL1, *ori_{E.c.}*, pUC18, promotor *P_{trc}*, indukce IPTG, represor *lacI*, rezistence ke spektinomycinu (Sp), 8319 bp (Hoffelder *et al.*, 2010)

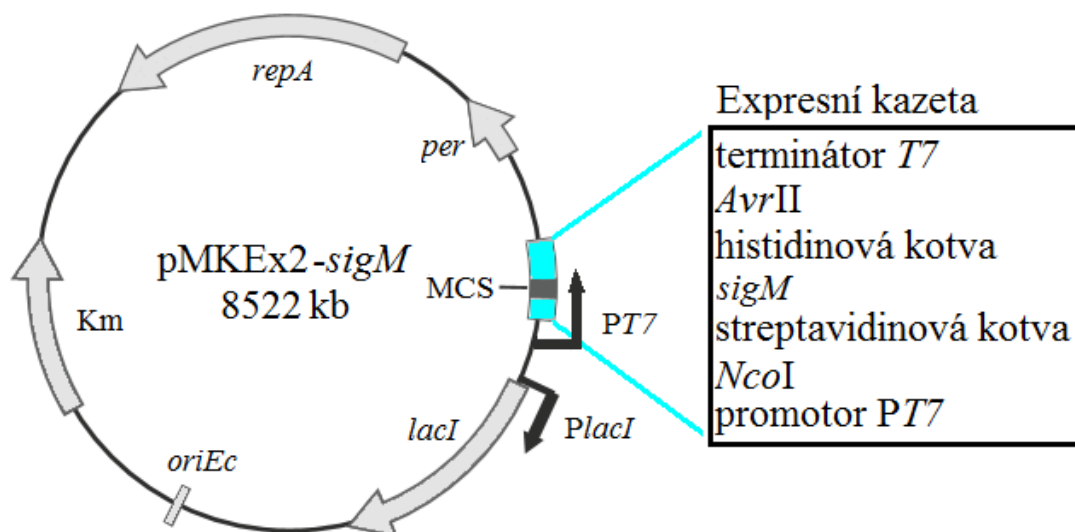
pEKEx3-gfpuv – pEKEx3 obsahující gen *gfpuv*, 9020 bp (Eggeling, nepublikováno)

pEPR1-Pcg0420 – promotor-test vektor, vložený promotor *Pcg0420* (Rucká, nepublikováno), indukce IPTG, rezistence ke kanamycinu (Km), 7337 bp (Knoppová *et al.*, 2007)

pET-22b-sigM – *E. coli* expresní vektor, promotor *PT7*, C-koncová histidinová kotva 6x(His-tag), rezistence k ampicilinu (Ap), 5970 bp (Novagen), ve vektoru je vložen gen *sigM* z *C. glutamicum* (Holátko, nepublikováno)

pMKEx2 – *E. coli*/*C. glutamicum* kyvadlový vektor zkonstruovaný na základě vektoru pJC1, *ori_{C.g.}* z pHM1519, *ori_{E.c.}* z pACYC177, *PT7*, *lacI*, *lacO1*, N-koncová streptavidinová kotva (Strep-tag II), C-koncová histidinová kotva 6x(His-tag), rezistence ke kanamycinu (Km), 8061 bp (Kortmann *et al.*, 2015)

pMKEx2-sigM – pMKEx2 obsahující gen *sigM* z plasmidu pET22b, promotor *PT7*, rezistence ke kanamycinu (Km), 8522 bp (tato práce, viz Obr. 5)



Obr. 5: Schématické znázornění vektoru pMKEx2 s genem *sigM*.

Gen *sigM* byl vkládán do MCS ohraničeného histidinovou a streptavidinovou kotvou. Modře zbarvená expresní kazeta obsahuje také promotor *PT7*, terminátor transkripce *T7* a místa pro štěpení restričními endonukleasami (enzymy *AvrII* a *NcoI* byly upravovány konce fragmentu *sigM*). *repA*: replikační gen, *per*: pozitivní regulátor kopií plasmidu, *PlacI*: promotor genu *lacI*, *lacI*: represor, *oriEc*: replikační počátek pro replikaci v *E. coli*, *Km*: markerový gen rezistence ke kanamycinu (upraveno podle Kortmann *et al.*, 2015).

4.10 Kultivace bakterií *Escherichia coli* a *Corynebacterium glutamicum*

Materiál:

Antibiotika – Ampicilin (Ap) (100 µg/ml), kanamycin (Km) (30 µg/ml), kanamycin Km (30 µg/ml) + tetracyklin Tc (10 µg/ml), spektinomycin Sp (150 µg/ml), tetracyklin Tc (10 µg/ml)

Tekuté médium 2xYT, CGXII

Postup:

Na plotnu s pevnou půdou 2xYT, byla zaočkována bakteriální kultura ze zásobní glycerolové konzervy, která byla uchovávána při -80 °C. Kmeny nesoucí plasmidy s determinantami resistencí na určitá antibiotika byly zaočkovány na selekčním médium 2xYT s přídatkem příslušného antibiotika. Kultivace *E. coli* probíhala v termostatu při 37 °C a buňky *C. glutamicum* byly kultivovány při 30 °C. Obvyklá doba růstu *E. coli* byla 12-16 h, doba růstu *C. glutamicum* trvala 24-35 h. Po nárůstu kultury na pevném médiu byly bakterie zaočkovány do tekutého média 2xYT, pro kultivaci *C. glutamicum* bylo použito také minimální médium CGXII, a kultivovány v kulaté baňce. Objem kultury nepřesahoval 1/10 objemu kultivační nádoby. Kultivace probíhala v příslušné teplotě pro daný druh za stálého třepání na rotační třepačce (Gallenkamp, otáčky 200 rpm). Kultura byla dále zpracována podle požadavků konkrétní metody.

4.10.1 Měření optické density

Do spektrofotometrických kyvet byl pipetován 1 ml kultury buněk (v pozdějších fázích kultivace byla kultura ředena čistým kultivačním médiem v poměru 1:10-1:100). Spektrofotometrem byla změřena hustota buněk při vlnové délce 600 nm (optická densita – OD₆₀₀).

4.11 Dlouhodobé uchovávání kmenů v glycerolové konzervě

Materiál:

50% (v/v) glycerol

Postup:

Do 5 ml média 2xYT s příslušným antibiotikem, byla zaočkována kolonie buněk a kultivována přes noc (~16 h) na třepačce při teplotě 30 °C. Následující den bylo z narostlé kultury odebráno 850 µl, k tomuto objemu bylo přidáno 150 µl 50% sterilního glycerolu a směs byla promíchána. Bakteriální kmen byl dále uchováván při -80 °C.

4.12 Izolace nukleových kyselin

4.12.1 Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí komerční soupravy

Materiál:

NucleoSpin[®] Plasmid

Postup:

Bakteriální kultura byla zaočkována do 5 ml tekutého média 2xYT s příslušným antibiotikem a kultivována do druhého dne na třepačce při 37 °C. Z narostlé kultury byly odebrány 3 ml a centrifugovány 2 min při 14000 x g, RT (laboratorní teplota). Supernatant byl odstraněn a z pelety byla izolována plasmidová DNA. Izolace byla provedena na principu alkalické lyze, postupem dle doporučení výrobce komerční soupravy. Izolovaná plasmidová DNA byla navázána na silikagelovou membránu kolonky Mini spin column a následně byla eluována 50 µl H₂O do mikrozkušavky. Poté byla změřena koncentrace izolované DNA pomocí spektrofotometru (NanoPhotometer UV/VIS) a velikost plasmidové DNA byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (viz 4.15). DNA byla dále uchovávána při -20 °C.

4.12.2 Miniizolace plasmidové DNA z *E. coli*

(upraveno podle Birnboim a Doly, 1979)

Materiál:

MF-Millipore (Merck, Německo)

Pufr GET – 50 mM glukosa, 10 mM Na₂EDTA, 25 mM Tris, pH = 8 – upraveno HCl

Roztok KAc – 3 M octan draselný, pH = 4,8 – upraveno ledovou kyselinou octovou

Roztok NaOH-SDS – 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS, vždy čerstvě připravený

70% (v/v) EtOH

96% (v/v) EtOH

Postup:

Bakteriální kultura byla zaočkována do 5 ml tekutého 2xYT média s příslušným antibiotikem a kultivován na třepačce při 37 °C do druhého dne. Následující den bylo 1,5 ml narostlé kultury pipetováno do mikrozkušavky a kultura centrifugována 1 min při 14000 x g, RT. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 100 µl pufru GET. K této suspenzi bylo dále přidáno 200 µl roztoku NaOH-SDS, obsah mikrozkušavky byl promíchán převrácením mikrozkušavky a suspenze byla

inkubována 5 min při RT. Poté bylo do mikrozkuhavky přidáno 150 μ l vychlazeného roztoku KAc, obsah mikrozkuhavky byl opět promíchán a po dobu 15 min probíhala inkubace v ledové lázni. Následně byla mikrozkuhavka centrifugována 10 min při 14000 x g, 4 °C. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkuhavky. K celkovému objemu supernatantu byl přidán 2,5násobný objem 96% EtOH a následovala precipitace po dobu dvou hodin při -20 °C. Pak byla mikrozkuhavka s precipitovanou DNA centrifugována 10 min při 14000 x g, 4 °C a poté byl supernatant odstraněn. Pelet byl promyt 200 μ l 70% EtOH a mikrozkuhavka znovu centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen pomocí evaporátoru (SpeedVac). Vysušený pelet byl rozpuštěn v 50 μ l H₂O a poté byla provedena dialýsa ve sterilní destilované H₂O po dobu 30 min s použitím nitrocelulosového membránového filtru MF-Millipore (velikost pórů 0,025 μ m). Byla změřena koncentrace izolované DNA pomocí spektrofotometru (NanoPhotometer UV/VIS) a následně byla ověřena velikost plasmidové DNA elektroforézou v agarosovém gelu (viz 4.15). DNA byla dále uchovávána při -20 °C.

4.12.3 Izolace plasmidové DNA z *C. glutamicum* pomocí komerční soupravy

Materiál:

NucleoBond® Xtra Midi

Roztok TE+L – 1 mM EDTA, lysozym (3 mg/ml), 10 mM Tris, pH = 8 – upraveno HCl

Postup:

Kultura *C. glutamicum* byla zaočkována do 100 ml média 2xYT s příslušným antibiotikem a kultivována na třepačce při 30 °C do druhého dne, kdy byla kultura převedena do 50ml kyvet a centrifugována 10 min při 4500 x g, RT. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 10 ml roztoku TE+L. Kyveta byla inkubována 2 h při teplotě 37 °C a v průběhu byl obsah kyvety dvakrát promíchán. Poté následovala centrifugace 5 min při 5000 x g, RT. Supernatant byl odstraněn a z peletu byla izolována plasmidová DNA dle návodu výrobce komerční soupravy NucleoBond® Xtra Midi. Izolovaná DNA byla eluována 5 ml H₂O z kolonky Midi gravity-flow column. Následně byla změřena koncentrace DNA a velikost plasmidové DNA byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (viz 4.15). Dále byla DNA uchovávána při -20 °C.

4.13 Extrakce DNA fenolem

Material:

Směs fenol:chloroform:isoamylalkohol v poměru 25:24:1

Směs chloroform:isoamylalkohol (24:1)

70% (v/v) EtOH

96% (v/v) EtOH

Postup:

Ke 100 μ l izolované DNA bylo přidáno 100 μ l směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol, směs v mikrozkuhavce byla důkladně protřepána a centrifugována 2 min při 12000 x g, RT. Poté byla odebrána horní vodná fáze do nové mikrozkuhavky. K vodné fázi byla přidána směs chloroform:isoamylalkohol v poměru 1:1, pro odstranění zbytků fenolu, obsah mikrozkuhavky byl důkladně promíchán a směs opět centrifugována za stejných podmínek. Po odstředění byla odebrána znovu horní vodná fáze a následovala precipitace DNA (viz 4.14).

4.14 Precipitace DNA ethanolem

Material:

Roztok KAc – 3M octan draselný, pH = 4,8 – upraveno ledovou kyselinou octovou

70% (v/v) EtOH

96% (v/v) EtOH

Postup:

K roztoku DNA byla přidána 1/10 objemu roztoku KAc a poté byla DNA precipitována dvojnásobným objemem 96% EtOH po dobu 2 hodin při -20 °C. Následně byla mikrozkuhavka s precipitovanou DNA centrifugována 10 min při 14000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet opláchnut 200 μ l 70% EtOH a směs opět centrifugována 5 min při 14000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen v evaporátoru (SpeedVac). Vysušený pelet byl rozpouštěn v 50 μ l H₂O a poté byla provedena dialýza po dobu 30 min s použitím nitrocelulosového membránového filtru MF-Millipore (velikost pórů 0,025 μ m). Vyizolovaná DNA byla dále uchovávána při -20 °C.

4.15 Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu

Materiál:

Agarosa

GelRed – ředění 1:100 000

Nanášecí roztok – 0,25% (w/v) bromfenolová modř, 30% (v/v) glycerol

Pufr TAE – 1 mM EDTA, 40 mM Tris, pH = 8 – upraveno ledovou kyselinou octovou

Velikostní standardy – GeneRuler Plus 100 bp DNA ladder, 1 kb DNA ladder

Postup:

Byl připraven agarosový gel o koncentraci 0,7%-1,5%, dle velikosti separované DNA. Agarosa byla rozpuštěna v pufru TAE. Poté byla aparatura, včetně gelu, přelita puftrem TAE. Vzorky DNA, i standard, byly smíchány s 1 μ l fluorescenčního barviva nukleových kyselin GelRed a 3 μ l nanášecího roztoku a poté pipetovány do jamek v agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala v konstantním napětím 5V/cm po dobu 1-1,5 h. Následně byl gel se separovanou DNA vizualizován pomocí transiluminátoru využívající UV záření a digitálním fotoaparátem KODAK vyfotografován. Snímek byl následně upraven počítačovým programem KODAK 1D *Image Analysis Software*.

4.16 Polymerasová řetězcová reakce (PCR)

Materiál:

GoTaq[®] DNA polymerasa (400000 U/ml)

Green GoTaq[®] Reaction Buffer (5x)

Templátová DNA

10 mM dNTP

10 μ M oligonukleotidové primery

Postup:

Byla připravena reakční směs o celkovém objemu 100 μ l, dle Tab. 2. Reakční směs byla v mikrozkuhavce promíchána, poté byla mikrozkuhavka vložena do cycleru a zahájena amplifikace úseku DNA dle Tab. 3.

Tab. 2: Složení reakční směsi PCR.

Složka	Objem ve 100 μ l
H ₂ O	70 μ l
pufr	20 μ l
dNTP	2 μ l
primer 1	3 μ l
primer 2	3 μ l
DNA	1 μ l
polymerasa	1 μ l

Tab. 3: Průběh PCR reakce.

Reakce	Teplota (°C)	Čas	počet cyklů
Denaturace	94	2 min	1
Denaturace	94	30 s	30
Hybridizace	T _m ^I	30 s	
Syntéza	72	40 s ^{II}	
Konečná syntéza	72	5 min	1

^IT_m (teplota tání DNA dle zastoupení GC párů) – teplota hybridizace oligonukleotidových primerů s řetězcem templátové DNA byla vypočítána podle T_m jednotlivých primerů.

^{II}Časový úsek syntézy byl nastaven podle velikosti syntetizovaného fragmentu (1 kb DNA = 1 min).

4.16.1 Přečištění fragmentu po PCR pomocí komerční soupravy

Materiál:

NucleoSpin[®] Gel and PCR purification

Postup:

Produkt PCR byl pipetován na kolonku Mini spin column a následující postup byl proveden dle doporučení výrobce soupravy pro purifikaci. Přečištěný fragment DNA byl z kolonky eluován 30 μ l H₂O.

4.17 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Material:

Pufry – CutSmart[®] Buffer (10x), NEBuffer 3.1 (10x)

Restrikční endonukleasy – *AvrII* (5000 U/ml), *EcoRI* (20000 U/ml), *NcoI* (10000 U/ml), *PstI* (20000 U/ml), *XhoI* (20000 U/ml)

Postup:

V mikrozkušavce byla připravena reakční směs: 10x koncentrovaný pufr, podle doporučení výrobce, množství 100-500 ng DNA, 1 µl restrikční endonukleasy a celkový objem byl doplněn H₂O do 20 µl. Tato směs byla promíchána a inkubována při 37 °C po dobu 2-4 h (delší doba štěpení pro lineární fragmenty DNA s restrikčními místy na koncích fragmentu).

4.18 Ligace lineárních fragmentů DNA

Material:

T4 DNA Ligase Buffer (10x)

T4 DNA Ligasa (400 U/µl)

50% (w/v) PEG 4000

Postup:

V mikrozkušavce byla připravena ligační směs

$$\frac{c(x) \cdot v(y)}{v(x)} \cdot MR = c(y)$$

$c(x)$ koncentrace vektoru (ng)

$v(x)$ velikost vektoru (kb)

$v(y)$ velikost insertu (kb)

$c(y)$ koncentrace insertu (ng)

MRmolární poměr insert/vektor (3:1)

Ligační směs dále obsahovala 1 µl 10x koncentrovaného ligačního pufru, 1 µl PEG a celkový obsah byl doplněn H₂O do 10 µl. Mikrozkušavka s ligační směsí byla inkubována v termobločku při 45 °C po dobu 5 min. Poté byla mikrozkušavka zchlazena v ledové lázni a ke směsi byl přidán 1 µl ligasy. Následně probíhala inkubace po dobu 2 h při 22 °C.

4.19 Transformace *E. coli* (Hanahan, 1983)

4.19.1 Příprava kompetentních buněk

Materiál:

Roztok RF1 – 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15% (v/v) glycerol, 80 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 mM octan K, 100 mM RbCl pH = 5,8 – upraveno ledovou kyselinou octovou (sterilizováno filtrací)

Roztok RF2 – 15% (v/v) glycerol, 70 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, pH = 6,8 – upraveno NaOH (sterilizováno filtrací)

Postup:

Bakteriální kultura *E. coli* DH5 α byla zaočkována do 50 ml 2xYT média na počáteční $\text{OD}_{600} = 0,1$. Kultivace probíhala na třepačce při 37 °C, dokud kultura nedosáhla hustoty buněk v rozmezí $\text{OD}_{600} = 0,2\text{--}0,3$. Poté byla kultura zchlazena a centrifugována v 50ml kyvetách 10 min při 5000 x g, 4°C. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet resuspendován v 17 ml roztoku RF1. Směs byla inkubována 15 min v ledové lázni. Opětovně proběhla centrifugace za stejných podmínek a po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve 4 ml roztoku RF2 a tato směs opět inkubována 15 min v ledové lázni. Na závěr byla tato suspenze kompetentních buněk rozplněna do mikrozkušavek po 200 μl a přímo použita pro transformaci nebo byly mikrozkušavky uchovávány při -80 °C.

4.19.2 Transformace *E. coli*

Postup:

Ke kompetentním buňkám bylo přidáno 10 μl ligační směsi nebo 0,2-0,5 μg plasmidové DNA. Mikrozkušavka byla ponechána 30 min v ledové lázni. Dále byla směs inkubována při 42 °C 90 s v termobloku a následně ihned zchlazena v ledové lázni. Do mikrozkušavky bylo přidáno 800 μl 2xYT média a obsah mikrozkušavky převeden do zkumavky. Poté probíhala kultivace na třepačce při 37 °C po dobu 45 min. Po kultivaci bylo vyseto 100 μl kultury na příslušné selektivní pevné médium 2xYT a kultura dále inkubována při 37 °C.

4.20 Transformace *C. glutamicum* **(Liebl *et al.*, 1989)**

4.20.1 Příprava kompetentních buněk *C. glutamicum*

Materiál:

Pufr GT – 10% (v/v) glycerol, 8 mM Tris, pH = 7,4 – upraveno HCl

10% (v/v) roztok glycerolu

Postup:

Bakteriální kultura byla zaočkována do 100 ml média NCM na $OD_{600} = 0,2$. Následně probíhala kultivace na třepačce při 30 °C, dokud nebylo dosaženo hustoty buněk v rozmezí $OD_{600} = 0,4–0,6$. Poté byla kultura zchlazena v ledové lázni, převedena do 50ml kyvet a centrifugována 10 min při 4500 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt v 50 ml ledového roztoku GT. Centrifugace a promytí peletu roztokem GT bylo ještě dvakrát zopakováno za stejných podmínek a nakonec byl pelet resuspendován v 1 ml ledového roztoku glycerolu. Na závěr byla suspenze pipetována do mikrozkušavek po 200 μ l a použita rovnou pro transformaci nebo byly mikrozkušavky uloženy při -80 °C.

4.20.2 Transformace *C. glutamicum* elektroporací

Postup:

K 200 μ l suspenze kompetentních buněk *C. glutamicum* bylo přidáno 0,5-1 μ g plasmidové DNA a směs byla inkubována 1 min v ledové lázni. Poté byla směs kompetentních buněk s DNA přepipetována do vychlazené elektroporační kyvety a následně provedena elektroporace (GenePulser – nastaveno napětí 2,5 kV, kapacita 25 μ F a vnější odpor 200 nebo 600 Ω , dle použitého kmene *C. glutamicum*). Ihned po elektrickém pulsu bylo do kyvety přidáno 800 μ l 2xYT média a suspenze byla pipetována do mikrozkušavky. Mikrozkušavka se suspenzí buněk byla v termobloku podrobena teplotnímu šoku 46 °C po dobu 6 min. Suspenze byla pak převedena do zkušavky a na třepačce probíhala inkubace po dobu 2 h při teplotě 30 °C. Nakonec bylo vyseto 100 μ l kultury na selektivní pevné médium 2xYT a kultura byla inkubována dva dny při 30 °C.

4.21 Měření intenzity fluorescence

4.21.1 Měření intenzity fluorescence v bezbuněčném extraktu

(upraveno podle Knoppová *et al.*, 2007)

Material:

Induktor IPTG (1 M)

Induktor Tc (250 ng/ml)

NuncloneTM Delta Surface (Sigma-Aldrich, USA)

Pufr PBS

Postup:

Tekuté médium 2xYT/CGXII (100-150 ml v 1000ml kulaté baňce) bylo zaočkováno buňkami *C. glutamicum* smytými z čerstvě narostlých agarových misek na počáteční $OD_{600} = 0,5-0,6$. Kultivace probíhala na třepačce při teplotě 30 °C, dokud nebylo dosaženo $OD_{600} = 1$. Poté byl odebrán objem vzorku kultury tak, aby bylo vždy odebráno přibližně 1,8 mg/ml buněk dle rovnice:

$$OD_{600} \cdot 0,3 = \text{biomasa/objem kultury [mg/ml]}$$

Zbývající kultura byla rozdělena do nových baněk po 50 ml a indukována různou koncentrací IPTG nebo Tc. Pro kontrolní kmen obsahující prázdný expresní vektor byla zvolena koncentrace 1 mM IPTG nebo 250 ng/ml, kmen nesoucí expresní vektor s insertem byl indukován IPTG o koncentraci 0,05-1 mM nebo Tc o koncentraci 25-250 ng/ml. Kultivace dále pokračovala za stejných podmínek. Vzorek kultury odebraný v čase 0 (před přidáním induktoru) byl zchlazen v ledové lázni a poté centrifugován 5 min při 5000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml pufru PBS. Tato suspenze byla opětne centrifugována 1 min při 14000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet finálně resuspendován v 500 µl PBS. Vzorky byly uchovávány v ledu a temnu. Dále byly odebírány vzorky po 3, 6 a 24 hodinách od přidání induktoru a byly zpracovávány obdobným způsobem. Jednotlivé vzorky kultury, ze všech časových úseků, byly přepipetovány do mikrozkušavek obsahujících 200 µl skleněných mikrokuliček (průměr 0,9 mm) a po dobu 1 min třikrát desintegrovány pomocí homogenizátoru rychlostí 6,5 m/s. Mikrozkušavky byly poté centrifugovány 20 min při 14000 x g, 4 °C. Poté bylo přepipetováno 250 µl supernatantu do nové mikrozkušavky a tento bezbuněčný extrakt byl opět centrifugován 10 min při 14000 x g, 4 °C. Následně bylo pipetováno 200 µl

bezbuněčného extraktu na mikrotitrační destičku Nunclone™ Delta Surface a byla změřena intenzita fluorescence pomocí fluorimetru Safire² s parametry měření dle Tab. 4. Fluorescence byla vztažena na množství proteinů (viz 4.22) v extraktu buněk (AU/mg protein).

Tab. 4: Nastavení parametrů přístroje Safire²

Parametr	Hodnota
Excitační vlnová délka	397 nm
Emisní vlnová délka	509 nm
Šířka excitační štěrby	5 nm
Šířka emisní štěrby	20 nm
Doba třepání	5 s
Doba pro ustálení	10 s
Režim snímání destičky	Spodní
Opakování měření	4

4.21.2 Měření intenzity fluorescence buněk *C. glutamicum* (Knoppová *et al.*, 2007)

Materiál:

Induktor IPTG (1 M)

Induktor Tc (250 ng/ml)

Nunclone® Multidishes 12 (Sigma-Aldrich, USA)

Nunclone™ Delta Surface (Sigma-Aldrich, USA)

Pufr PBS

Postup:

Bakteriální kultura, narostlá na pevné půdě, byla zaočkována do 2 ml 2xYT média na OD₆₀₀ = 0,5-0,6. Kultivace probíhala ve vícejamkové kultivační destičce Nunclone® Multidishes na třepačce při 30 °C. Na kultivační destičce byly kultivovány vždy dva stejné kmeny pro následnou indukci jednoho z nich. Po dosažení OD₆₀₀ = 1 byl odebrán vzorek kultury v čase 0 (před přidáním induktoru), který byl zředěn na OD₆₀₀ = 0,2. Poté byla kultura indukována IPTG o koncentraci 0,5 mM nebo Tc o koncentraci 250 ng/ml. Dále probíhala kultivace za stejných podmínek. Vzorky odebrané v čase 0 byly centrifugovány 1 min při 14000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt v 500 µl pufru PBS. Opět proběhla centrifugace za stejných podmínek, supernatant byl odstraněn a pelet finálně resuspendován v 500 µl pufru PBS.

Další vzorky byly odebírány po 3, 6 a 24 hodinách od přidání induktoru a zpracovány obdobným způsobem. Vzorky byly udržovány v ledové lázni. Po každém odběru bylo pipetováno 200 μ l vzorku na mikrotitrační destičku Nunc Delta Surface a fluorimetrem Safire² byla změřena intenzita fluorescence vztažená na optickou densitu buněk (AU/OD₆₀₀).

4.22 Měření koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu (Bradford, 1976)

Materiál:

BSA (10 mg/ml)

Činidlo Bradfordové – 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant blue G-250, 43% (v/v) EtOH, 8,5% (v/v) H₃PO₄

Postup:

Do spektrofotometrických kyvet bylo pipetováno 980 μ l činidla Bradfordové a 20 μ l bezbuněčného extraktu (viz 4.21.1) či zásobních roztoků standardů BSA o koncentracích 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 μ g/ml, pro vytvoření kalibrační křivky. Obsah kyvet byl promíchán, 10 min inkubován v RT a poté bylo změřeno OD₅₉₅. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla odečtena podle kalibrační křivky.

4.23 Analýza populace buněk *C. glutamicum* průtokovou cytometrií

Materiál:

Induktor IPTG (1 M)

Induktor Tc (250 ng/ml)

Pufr PBS

Postup:

Bakteriální kultura, narostlá na pevné půdě, byla zaočkována do 50 ml 2xYT média na OD₆₀₀ = 0,5-0,6 a kultivována na třepačce při 30 °C. Po dosažení OD₆₀₀ = 1 byl do mikrozkuřavky odebrán nultý vzorek (před přidáním induktoru) a to v objemu 100 μ l kultury. Kultura byla rozdělena do dvou baněk, přičemž jedna kultura sloužila jako kontrola (neindukována) a druhá byla indukována 0,5 mM IPTG nebo 250 ng/ml. Kultivace probíhala nadále za stejných podmínek, přičemž dalších 100 μ l vzorku kultury bylo odebíráno po 3, 6 a 24 hodinách od přidání induktoru. Jednotlivé vzorky byly vždy centrifugovány 1 min při 14000 x g, 4°C. Supernatant byl odstraněn, pelet

promyt v 500 μ l pufru PBS a opětne centrifugován za stejných podmínek. Pelet byl finálně resuspendován v 500 μ l pufru PBS. Vzorky buněk byly uchovávány v ledu a temnu a následně analyzovány průtokovým cytometrem (maximum emisní vlnové délky 525 nm, excitace 488 nm, měřeno 20000-22000 buněk každého vzorku).

4.24 Indukce exprese genu pro produkci proteinu

Materiál:

Induktor IPTG (1 M)

Pufr P

Postup:

Bakteriální kultura byla zaočkována do 100 ml 2xYT média na počáteční $OD_{600} = 0,3$ a kultivována na třepačce při 30 °C, dokud nedosáhla hustoty buněk $OD_{600} = 1$. Poté byl objem kultury rozdělen do dvou baněk, kdy jedna sloužila jako kontrola a druhá byla indukována 0,1 mM IPTG. Následně probíhala kultivace přes noc (~16 h) na třepačce při 20 °C. Po kultivaci byla kultura zchlazena v ledové lázni a centrifugována v 50ml kyvetách 10 min při 5000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt v 10 ml pufru P a kyveta opětovně centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 10 ml pufru P. Následně bylo provedeno rozrušení buněčných struktur pomocí sonikátoru. Sonikace probíhala 10x 30 sec (amplituda 20 %) za stálého chlazení v ledové lázni. Opakování se provádělo vždy alespoň po 1 min inkubace suspenze v ledové lázni. Rozbité buňky byly centrifugovány v centrifugační zkumavce s kulatým dnem 20 min při 27000 x g, 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant převeden do nové 50ml kyvety a pelet resuspendován v 5 ml pufru P. Poté následovala izolace proteinů ze supernatantu afinitní chromatografií (viz 4.26) a pelet byl použit pro analýzu pomocí SDS-PAGE (viz 4.28) nebo pro extrakci proteinů močovinou (viz 4.27).

4.25 Indukce exprese genu při vysokoprodukční kultivaci

Materiál:

EnPresso[®] B

Induktor IPTG (1 M)

Odpěnovadlo Antifoam 204

Pufr P

Postup:

Dle návodu komerční soupravy EnPresso[®] B bylo připraveno vysokoprodukční médium. Tableta média byla rozpuštěna v 50 ml H₂O. Do baňky bylo dále přidáno 5 μ l odpěnovadla a 25 μ l činidla A (součástí soupravy). Následně byla zaočkována bakteriální kultura na počáteční OD₆₀₀ = 0,2 a kultivována 16 h na třepačce (Gallenkamp, otáčky 180 rpm) při 30 °C. Poté byla kultura indukována 20 μ M IPTG. Ke kultuře bylo přidáno dalších 75 μ l činidla A a kultivace probíhala po dobu 24 h na třepačce při 20 °C. Druhý den byla kultura zchlazena v ledové lázni, převedena do 50ml kyvet a centrifugována 10 min při 4500 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt ve 12 ml pufru P a kyveta opětne centrifugována. Pelet byl resuspendován v 10 ml pufru P a buněčné struktury byly poté rozrušeny pomocí sonikátoru. Sonikace byla provedena celkem 10x po dobu 30 s (amplituda 20 %) a probíhala za stálého chlazení v ledové lázni. Před každým opakováním byla suspenze inkubována v ledové lázni alespoň 1 min. Rozbité buňky byly centrifugovány v centrifugační zkumavce s kulatým dnem 20 min, při 27000 x g, 4 °C. Supernatant byl převeden do nové kyvety a pelet resuspendován v 5 ml pufru P. Ze supernatantu byly izolovány proteiny afinitní chromatografií (viz 4.26) a pelet byl použit pro analýzu pomocí SDS-PAGE (viz 4.28) nebo pro extrakci močovinou (viz 4.27).

4.26 Izolace proteinů metodou afinitní chromatografie

Materiál:

Poly-Prep[®] Chromatography Columns (Bio-Rad, Německo)

Pufr P

Pufr P+imidazol (1 M)

TALON[®] Metal Affinity Resin

Postup:

Do 50ml kyvety bylo pipetováno 1,5 ml TALON[®] Metal Affinity Resin (TALON), který byl promyt 10 ml pufru P a kyveta centrifugována 2 min při 2500 x g, 4 °C. Po centrifugaci byla odebrána horní fáze pufru a promytí bylo zopakováno přidáním 5 ml pufru P. Supernatant získaný po centrifugaci sonikovaných buněk (viz metoda 4.24 a 4.25) byl přidán do kyvety obsahující TALON a probíhala vazba proteinů na TALON po dobu 1 h při 4 °C na rotátoru. Poté byla kyveta centrifugována 5 min při 5000 x g, 4 °C. Supernatant byl odebrán a uschován jako kontrolní vzorek po vazbě na TALON pro analýzu pomocí SDS-PAGE. Následně byla připravena aparatura pro jímání proteinů s chromatografickou kolonkou Poly-Prep[®] pro zachycení proteinů. Na kolonku preekvilibrovanou 5 ml pufru P byl nanesen odstředěný TALON s navázanými proteiny a následovalo promytí 10 ml pufru P. Poté byla provedena eluce proteinů 750 µl roztoku pufr P+imidazol o vzestupné koncentraci (50-300 mM) a jednotlivé frakce byly jímány do mikrozkušavek. Práce probíhala při 4 °C. Vzorky izolovaných proteinů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz 4.28).

4.26.1 Zakoncentrování eluátů a dialýza**Materiál:**

Amicon[®] Ultra-15 (Merck, Německo)

D-TubeTM Dialyzer Midi (Merck, Německo)

Pufr skladovací – 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 3 mM 2-merkapt ethanol (přidán po sterilizaci), pH = 8 – upraveno HCl

100% (v/v) glycerol

Postup:

Do kyvety Amicon[®] Ultra-15 (propustnost 10 kDa) byly pipetovány vzorky po eluci imidazolem (viz metoda 4.26) a kyveta centrifugována, dokud nezbyl objem 500 µl, který mohl být pipetován na kolonku D-TubeTM Dialyzer Midi (propustnost 6-8 kDa) pro dialýzu. Kolonka byla vložena do plastového plováku v kádince s 500 ml skladovacího pufru a dialýza probíhala přes noc (~16 h) při 4 °C. Druhý den byl skladovací pufr vyměněn a dialýza pokračovala dále po dobu 4 h. Na závěr byl ke vzorku přidán glycerol v poměru 1:1.

4.27 Močovinová extrakce proteinů

Materiál:

Močovina v pufru P (8 M)

Pufr P

Tris-HCl (50 mM)

Postup:

Do mikrozkušavky byl pipetován 1 ml sonikovaných buněk resuspendovaných v pufru P (viz metoda 4.24 a 4.25). Suspenze buněk byla centrifugována 1 min při 14000 x g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k peletu přidán 8 M roztok močoviny. Pelet byl s močovinou promíchán a poté byl k této směsi přidán 1 ml Tris-HCl. Následně byla močovina a proteiny rozpouštěny po dobu 30 min při 4 °C na rotátoru. Poté byla mikrozkušavka centrifugována 10 min při 14000 x g, 4 °C. Získaný supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky pro analýzu pomocí SDS-PAGE (viz 4.28).

4.28 Elektroforetická analýza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Materiál:

Color Protein Standard, Broad Range (9-170 kDa)

Nanášecí pufr NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)

Pufr pro SDS-PAGE – 192 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris, pH = 8,3 – upraveno HCl

TEMED

10% (w/v) APS

40% (w/v) akrylamid

Postup:

Pro přípravu 30% polyakrylamidového gelu byly smíchány jednotlivé složky dle Tab. 5 a pipetovány mezi skla připravené aparatury. Po ztuhnutí gelu byla aparatura zalita pufrům pro SDS-PAGE. Analyzované vzorky a proteinový velikostní standard byly smíchány s 3 µl nanášecího pufru NuPAGE LDS Sample Buffer, denaturovány po dobu 5 min při 95 °C a následně přepipetovány do promytých jamek v gelu. Elektroforéza byla spuštěna zpočátku na 50 V a zvýšena na 70 V ve chvíli, kdy vzorky doputovaly do separačního gelu. Po ukončení separace proteinů byl gel obarven a následně vizualizován (viz 4.28.1).

Tab. 5: Složení separačního a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

Složka	Separační gel 10%	Zaostřovací gel 12%
H₂O	3 ml	1,92 ml
akrylamid	1,5 ml	336 µl
Pufr pro separační gel	1,5 ml	-
Pufr pro zaostřovací gel	-	756 µl
APS	24 µl	12 µl
TEMED	12 µl	6 µl

4.28.1 Barvení a odbarvování polyakrylamidového gelu

Materiál:

Roztok barvicí – 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 10% (v/v) ledová kyselina octová, 45% (v/v) methanol

Roztok odbarvovací – 10% (v/v) ledová kyselina octová, 40% (v/v) methanol

Postup:

Gel SDS-PAGE byl ponořen do barvicího roztoku a barvení probíhalo po dobu 30-45 min na kývačce. Poté byl barvicí roztok v nádobě vyměněn za odbarvovací roztok a po dobu 45-60 min probíhalo odbarvování. Gel byl na závěr vyfotografován digitálním fotoaparátem KODAK a snímek upraven počítačovým programem KODAK 1D *Image Analysis Software*.

5 Výsledky

Diplomová práce je zaměřena na studium vlastností expresních vektorů pro *C. glutamicum*, a to zejména na zjišťování podmínek exprese klonovaných genů a její účinnosti. Pro analýzu míry exprese byly použity tři expresní plasmidové vektory, u nichž byla sledována produkce fluorescenčního proteinu Gfpuv prostřednictvím měření intenzity fluorescence buněk a jejich extraktů. Kromě míry exprese byla pomocí průtokové cytometrie zjišťována i hladina bazální exprese bez přidání induktoru a homogenita populací buněk z hlediska produkce Gfpuv. Jeden z vektorů byl pak použit pro analýzu regulace vybraného promotoru z *C. glutamicum* podjednotkou sigma (σ) RNA polymerasy. Další vektor umožňující vysokou produkci proteinů v *C. glutamicum* posloužil pro izolaci a purifikaci proteinu σ^M , který se zatím po heterologní expresi genu *sigM* (z *C. glutamicum*) v hostiteli *E. coli* nepodařilo izolovat v rozpustné formě.

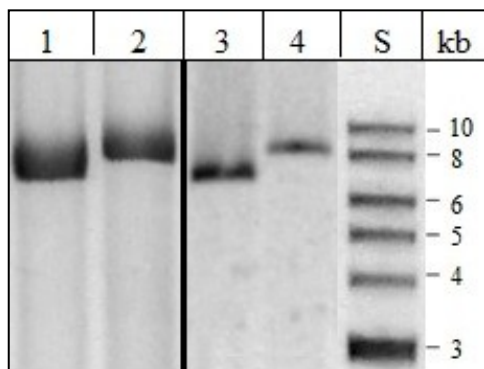
Získané poznatky by měly přispět k poznání vlastností expresních vektorů pro *C. glutamicum*, které jsou v Laboratoři molekulární genetiky bakterií MBÚ AV ČR, v. v. i. používány pro studium rolí sedmi faktorů σ v *C. glutamicum* při transkripci z promotorů různých tříd a pro definování regulonů řízených jednotlivými faktory σ .

5.1 Stanovení míry genové exprese při použití vektorů pEC-XT99A, pEKEx3 a pCLTON1

5.1.1 Příprava klonů *C. glutamicum* nesoucích expresní vektory s vloženým modelovým genem *gfpuv*

Pro porovnání účinnosti exprese genů klonovaných ve vektorech pEC-XT99A, pEKEx3 a pCLTON1 byla měřena exprese modelového genu *gfpuv* klonovaného v každém z nich. V případě vektorů pEKEx3-*gfpuv* a pEC-XT99A-*gfpuv*, které nesou promotor *P_{trc}*, byla exprese indukována IPTG, zatímco exprese z vektoru pCLTON1-*gfpuv* s promotorem *P_{tet}*, byla indukována tetracyklinem. Jako kontrola byl vždy použit odpovídající kmen s prázdným vektorem. Plasmidové konstrukty pEKEx3-*gfpuv*, pEC-XT99A-*gfpuv* a pCLTON1-*gfpuv* i prázdné vektory byly izolovány z příslušných kmenů *E. coli*. Plasmidovou DNA byl poté transformován kmen *C. glutamicum* ATCC 13032 a její přítomnost v buňkách *C. glutamicum* byla ověřena izolací plasmidové DNA z transformantů. Identita plasmidových DNA z *E. coli* a *C. glutamicum* byla potvrzena

štěpením restriční enzymem, který jejich kruhovou molekulu linearizuje. Restriční analýza plasmidu pCLTON1-*gfpuv* enzymem *Pst*I je jako příklad dokumentována na Obr. 6. Vybrané klony *C. glutamicum* nesoucí plasmid pEC-XT99A-*gfpuv*, pEKEx3-*gfpuv* nebo pCLTON1-*gfpuv* byly dále použity pro stanovení míry genové exprese.

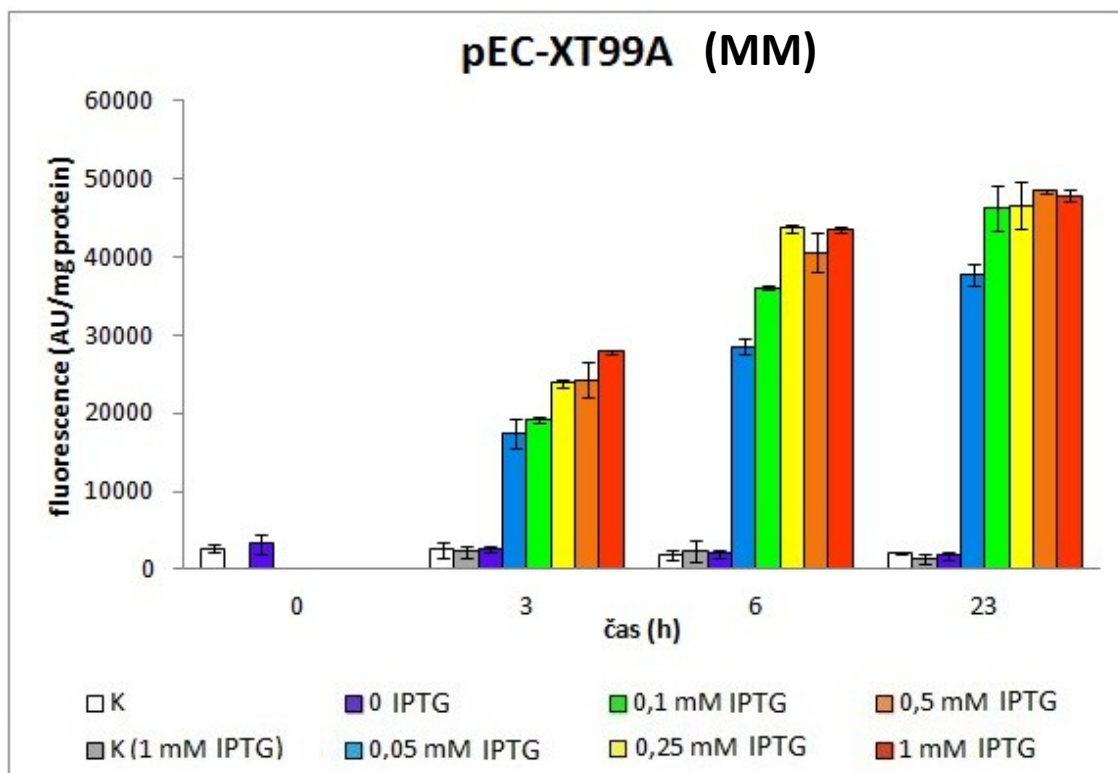


Obr. 6: Elektroforéza plasmidových DNA linearizovaných štěpením restričním enzymem *Pst*I v 0,7% agarosovém gelu.

1: *E. coli*(pCLTON1), 2: *E. coli*(pCLTON1-*gfpuv*), 3: *C. glutamicum* (pCLTON1)
 4: *C. glutamicum* (pCLTON1-*gfpuv*), S: velikostní standard (1 kb)
 (velikost plasmidů: pCLTON1 (7,939 kb), pCLTON1-*gfpuv* (8,637 kb))

5.1.2 Stanovení míry genové exprese v bezbuněčném extraktu působením různé koncentrace induktoru.

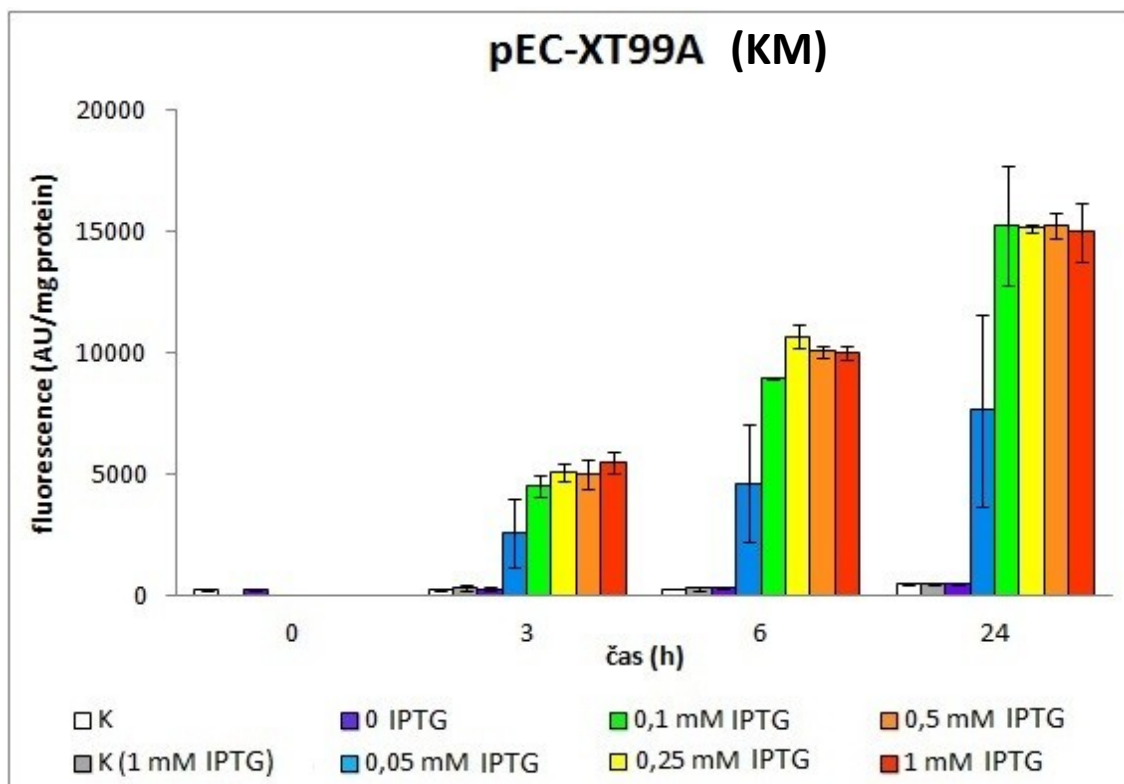
Pro zjištění optimálních podmínek genové exprese byla měřena intenzita fluorescence produkovaného proteinu Gfpuv v závislosti na koncentraci induktoru (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 a 1 mM IPTG nebo 25, 50, 100, 150 a 250 ng/ml Tc). Kultivace kmenů nesoucích testované plasmidové konstrukty probíhala jednak v komplexním médiu 2xYT, a také v minimálním médiu CGXII a to při 30 °C. V případě kmene *C. glutamicum* nesoucího konstrukt založený na vektoru pEC-XT99A bylo do média přidáváno antibiotikum Tc (10 µg/ml), pro kmen s vektorem pEKEx3 byl použit Sp (150 µg/ml) a ke kmenu s vektorem pCLTON1 byl přidáván Km (30 µg/ml). Jako kontrola, ke stanovení fluorescence v kmenech obsahujících plasmid s reportérovým genem *gfpuv*, byla změřena fluorescence v extraktu buněk nesoucích prázdný vektor. Výsledky měření exprese z jednotlivých vektorů jsou znázorněny na Obr. 7-12.



Obr. 7: Expres genů *gfpuv* z vektoru pEC-XT99A při kultivaci *C. glutamicum* v minimálním médiu CGXII.

Expres genů *gfpuv* byla indukována přidavkem různého množství IPTG v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstruktem pEC-XT99A-*gfpuv*, bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K: buňky s prázdným vektorem pEC-XT99A). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

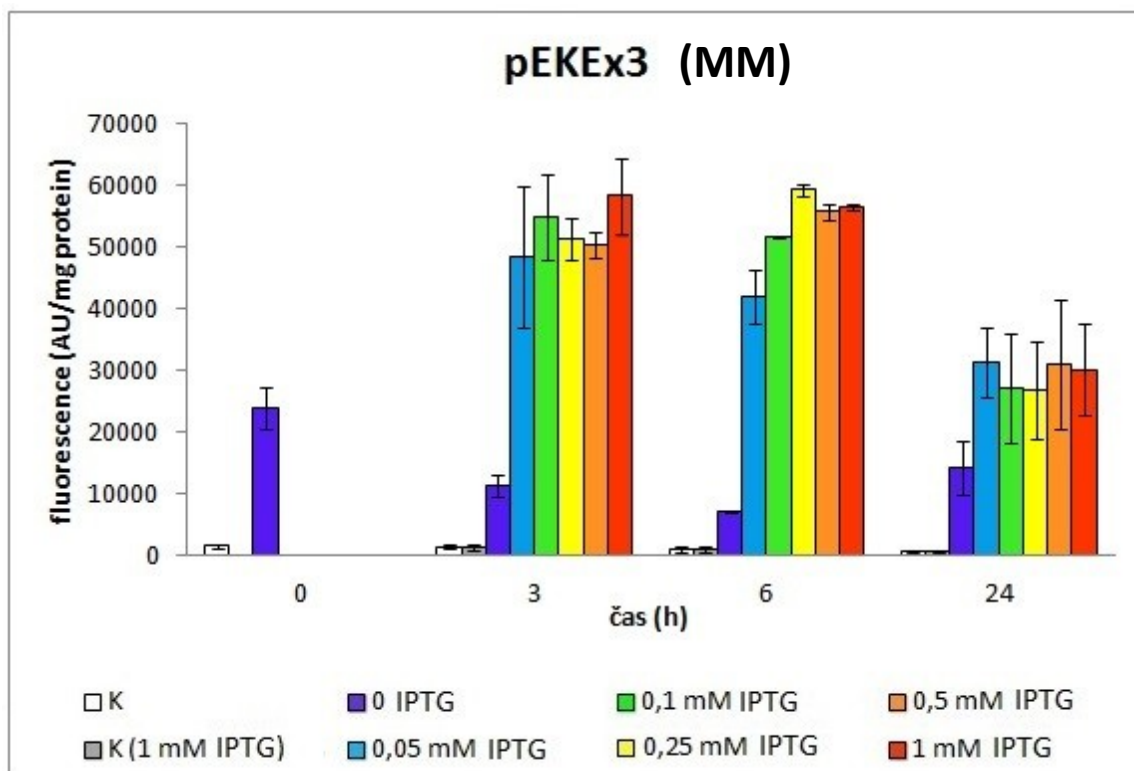
Výsledek měření exprese genů *gfpuv* v kmeni *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) rostoucím v minimálním médiu znázorněného na Obr. 7 vyplývá, že mírnou závislost genové exprese na koncentraci induktoru, projevenou zvyšující se intenzitou fluorescence, vykazuje kultura ve 3. hodině a částečně i v 6. hodině kultivace. Ve 24. hodině je již úroveň genové exprese, s výjimkou nejnižší testované koncentrace IPTG (0,05 mM), pro všechny koncentrace induktoru téměř shodná. Z hodnot získaných pro kmen *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) bez přidavku IPTG je zřejmé, že bazální exprese *gfpuv* je prakticky nulová.



Obr. 8: Expresa genu *gfpuv* z vektoru pEC-XT99A při kultivaci *C. glutamicum* v komplexním médiu 2xYT.

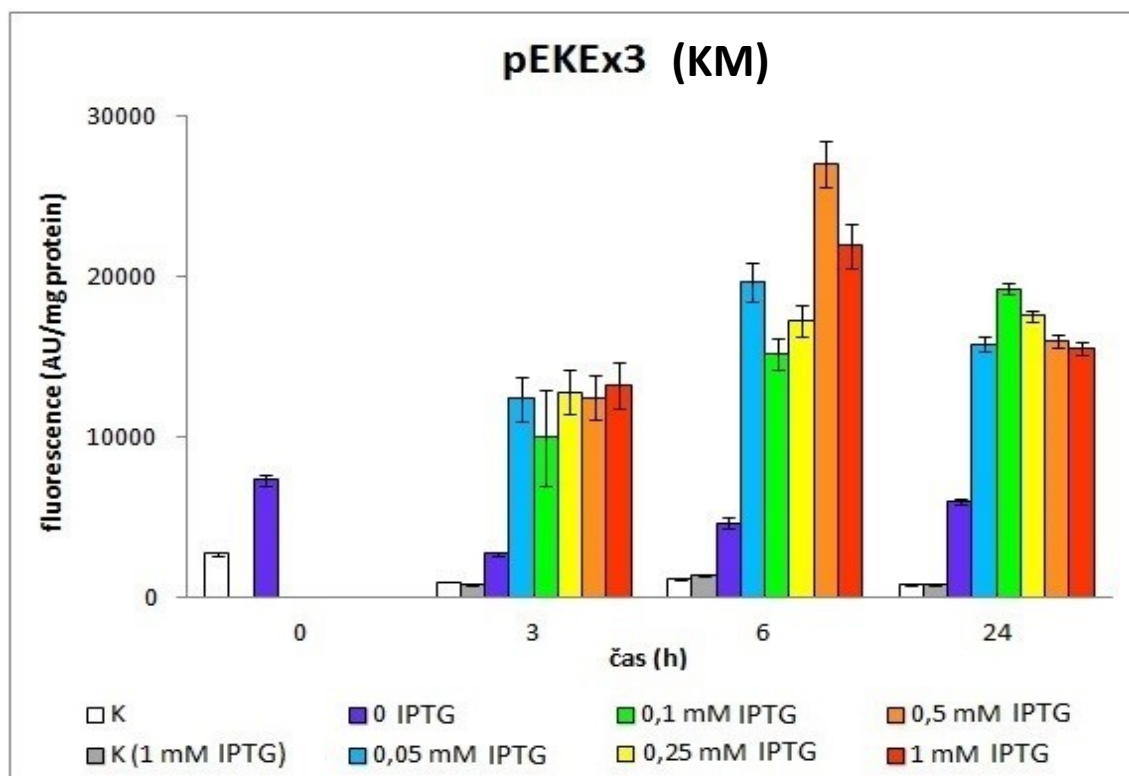
Expresa genu *gfpuv* byla indukována přidavkem různého množství IPTG v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstruktem pECXT99A-*gfpuv*, bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K: buňky s prázdným vektorem pEC-XT99A). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledků měření exprese genu *gfpuv* kmene *C. glutamicum*(pEC-XT99A) při kultivaci v komplexním médiu (Obr. 8) je zřejmé, že s výjimkou nejnižší koncentrace induktoru (0,05mM IPTG) je genová exprese pro všechny koncentrace induktoru ve všech sledovaných hodinách srovnatelná. I v tomto případě není bazální hladina exprese (bez přidavku induktoru) měřitelná a promotor je tedy zřejmě silně reprimován.



Obr. 9: Exprese genu *gfpuv* z vektoru pEKEx3 při kultivaci *C. glutamicum* v minimálním médiu CGXII. Exprese genu *gfpuv* byla indukována přidavkem různého množství IPTG v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstruktem pEKEx3-*gfpuv*, bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K: buňky s prázdným vektorem pEKEx3). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

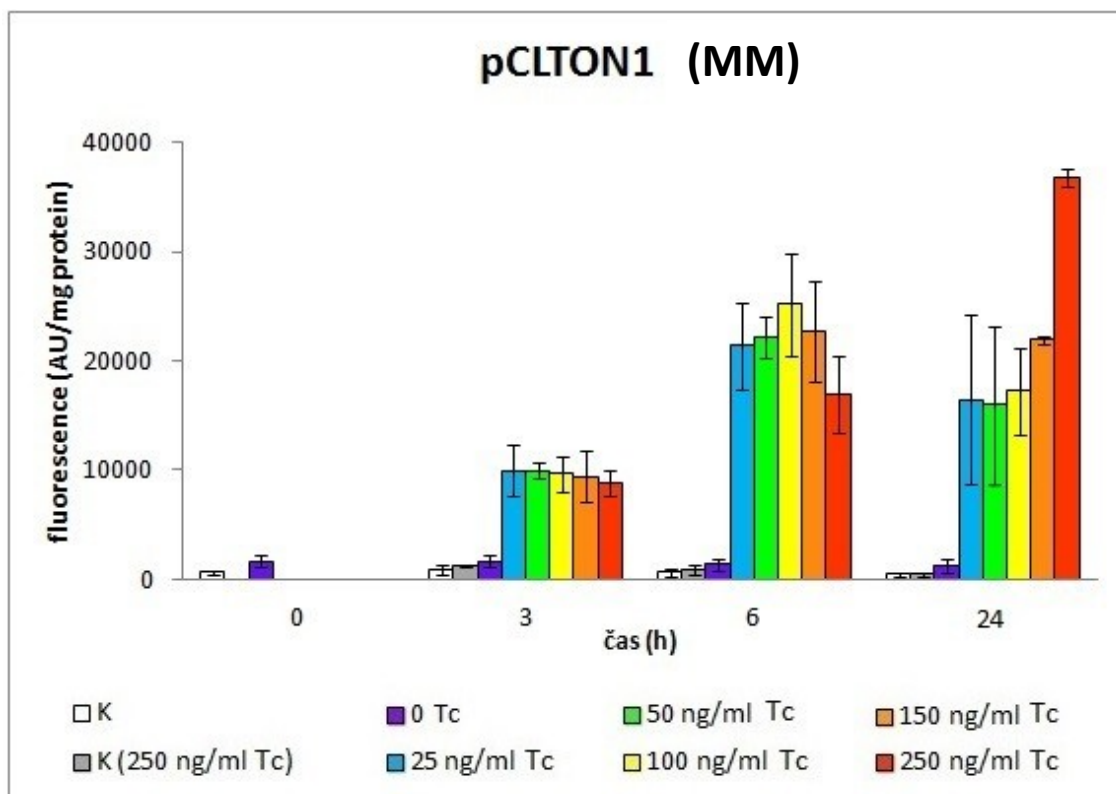
Z výsledků uvedených na Obr. 9 zobrazujících expresi genu *gfpuv* z vektoru pEKEx3 při kultivaci v minimálním médiu lze vyvodit, že intenzita fluorescence, vyvolaná působením různé koncentrace induktoru, se téměř shoduje, tudíž hladina exprese není podmíněna množstvím induktoru. Zároveň je u tohoto vektoru zjevná vysoká hladina bazální exprese (bez přidání induktoru).



Obr. 10: Exprese genu *gfpuv* z vektoru pEKEx3 při kultivaci *C. glutamicum* v komplexním médiu 2xYT.

Expresa genu *gfpuv* byla indukována přidávkou různého množství IPTG v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstruktem pEKEx3-*gfpuv*, bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K: buňky s prázdným vektorem pEKEx3). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

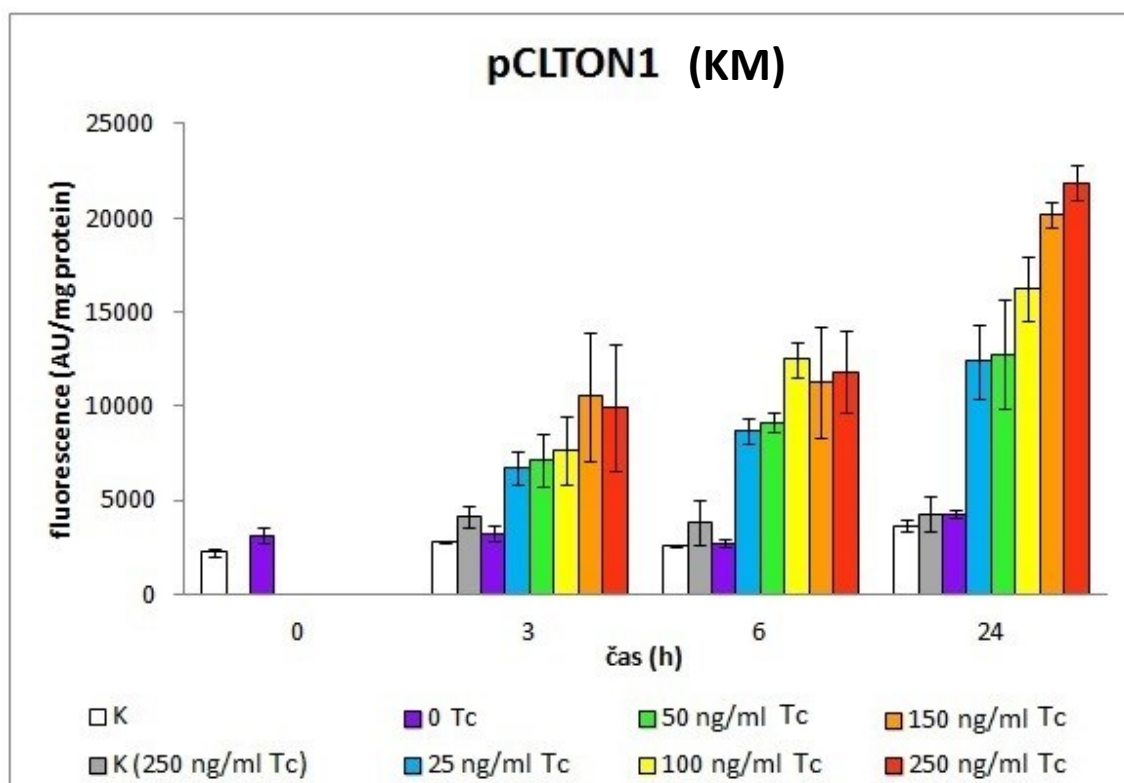
Výsledky měření exprese genu *gfpuv* z vektoru pEKEx3 při kultivaci v komplexním médiu (Obr. 10) naznačují, že hladina exprese téměř nezávisí na koncentraci induktoru v použitém rozsahu, neboť ve všech případech je dosaženo přibližně stejné intenzity fluorescence. Z výsledku je rovněž patrná vysoká bazální exprese.



Obr. 11: Expresa genu *gfpuv* z vektoru pCLTON1 při kultivaci *C. glutamicum* v minimálním médiu CGXII.

Expresa genu *gfpuv* byla indukována přidavkem různého množství Tc v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstruktem pCLTON1-*gfpuv*, bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K; buňky s prázdným vektorem pCLTON1). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledků měření exprese genu *gfpuv* z vektoru pCLTON1 při kultivaci v minimálním médiu (Obr. 11) lze vyvodit, že hladina exprese, vyjádřená intenzitou fluorescence, není závislá na zvyšující se koncentraci induktoru, kromě nejvyšší použité koncentrace induktoru po 24 h kultivace. Také je zjevná velmi nízká úroveň bazální exprese.



Obr. 12: Expresa genu *gfpuv* z vektoru pCLTON1 při kultivaci *C. glutamicum* v komplexním médiu 2xYT.

Expresa genu *gfpuv* byla indukována přidavkem různého množství Tc v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstruktem pCLTON1-*gfpuv*, bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K; buňky s prázdným vektorem pCLTON1). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

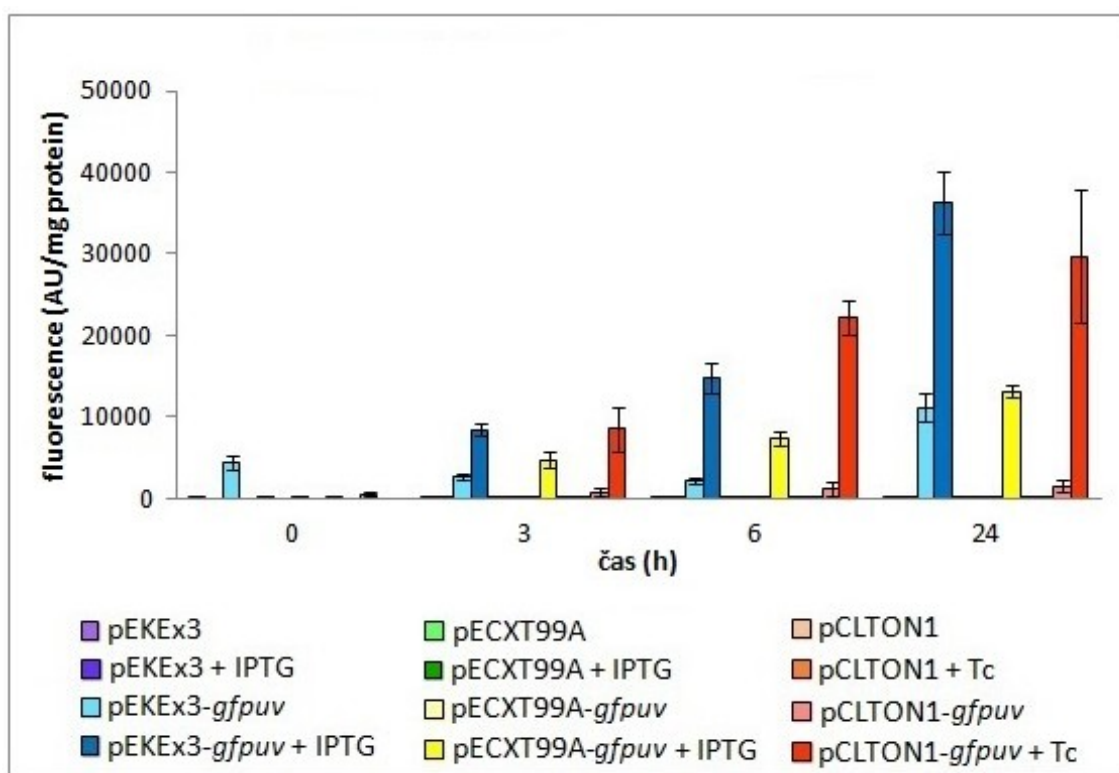
Výsledek měření exprese genu *gfpuv* z vektoru pCLTON1 znázorněný na Obr. 12 vypovídá, že při růstu v komplexním médiu je síla exprese závislá na množství induktoru, neboť dochází k postupně se zvyšující intenzitě fluorescence, což je patrné zejména v čase 24 h. Také je zjevná nepřítomnost bazální exprese.

5.1.3 Porovnání exprese genu *gfpuv* u všech studovaných expresních vektorů při souběžné kultivaci.

Intenzitou fluorescence, vztaženou na koncentraci proteinů, lze vyhodnotit míru exprese modelového genu *gfpuv*. Naměřená fluorescence je ale bezrozměrná veličina, vyjádřená v arbitrárních jednotkách (AU) na mg proteinu, a její intenzita může vykazovat určité rozdíly v různých měřeních v závislosti na podmínkách,

např. při změnách nastavení citlivosti fluorimetru. Pro přímé srovnání míry exprese z jednotlivých vektorů byla provedena souběžná kultivace všech kmenů nesoucích studované expresní vektory a následně měřena intenzita fluorescence příslušných bezbuněčných extraktů za stejných podmínek a nastavení fluorimetru.

Na základě předešlých výsledků měření intenzity fluorescence bezbuněčného extraktu indukovaných kultur jednotlivých expresních vektorů, bylo pro tento srovnávací experiment zvoleno jako optimální médium 2xYT. Pro indukci exprese genu *gfpuv* v případě kmenů *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) a *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) byla zvolena koncentrace induktoru 0,5 mM IPTG a pro kmen *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) 250 ng/ml Tc.



Obr. 13: Exprese genu *gfpuv* z vektorů pEC-XT99A, pEKEx3 a pCLTON v *C. glutamicum*.

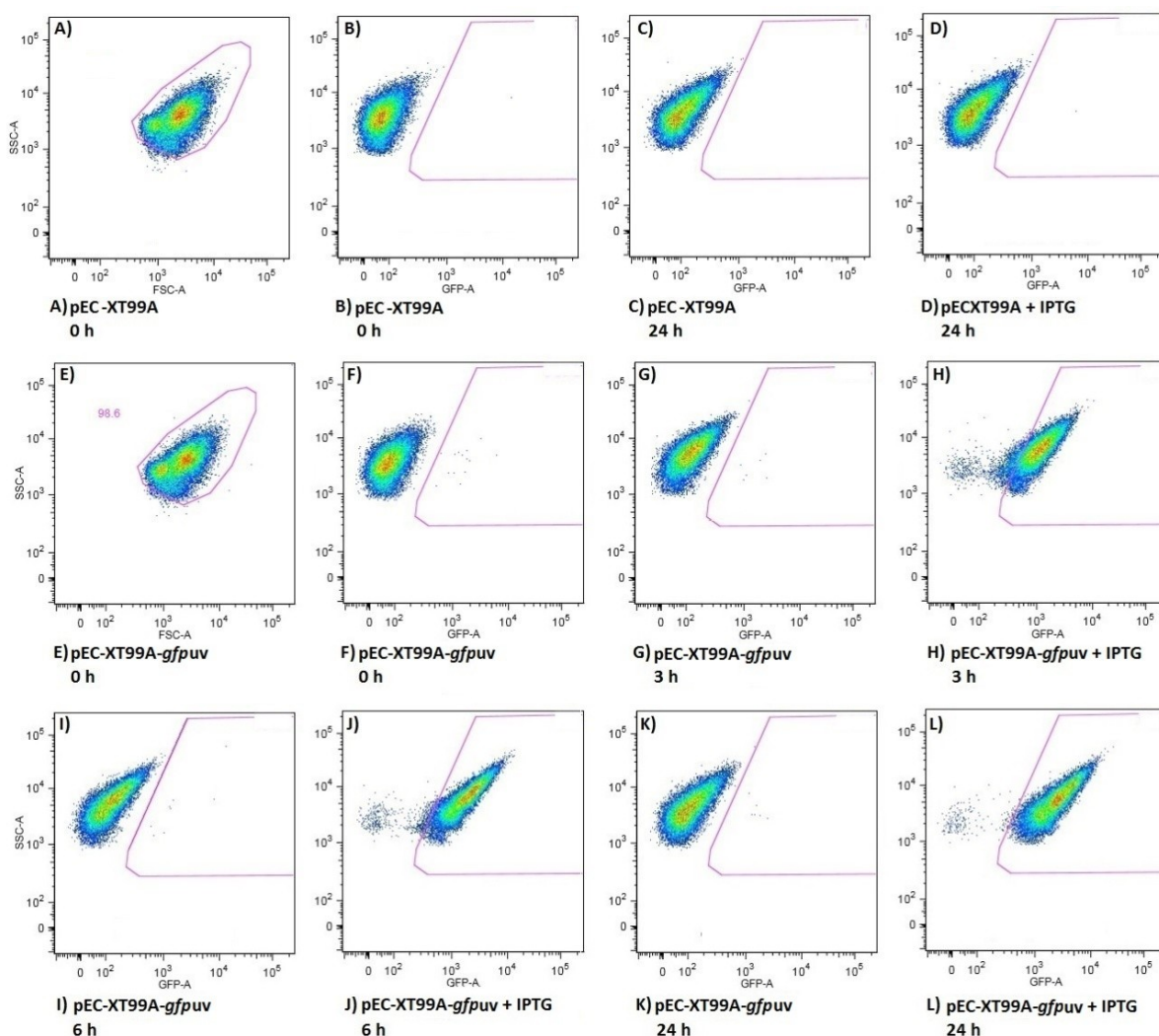
Kultivace probíhala v komplexním médiu 2xYT, exprese genu *gfpuv* byla indukována přidavkem IPTG nebo Tc v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk s konstrukty pEC-XT99A-*gfpuv*, pEKEx3-*gfpuv* a pCLTON-*gfpuv*. Sloupce znázorňující intenzitu fluorescence extraktů buněk s prázdnými vektory, jejichž hodnoty jsou velmi nízké, poskytují hladinu pozadí (přirozenou fluorescenci buněk *C. glutamicum*). Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledku porovnání exprese genu *gfpuv* ze studovaných expresních vektorů v paralelní kultivaci, uvedeného na Obr. 13, vyplývá, že nejvyšší účinnost genové exprese vykazuje expresní vektor pEKEx3 a nejnižší produkci reportérového proteinu Gfpuv naopak vektor pEC-XT99A. Při porovnání intenzit fluorescence neindukovaných kultur je patrné, že hladina bazální exprese (bez přídavku induktoru) je poměrně vysoká u vektoru pEKEx3 a slabší i u pCLTON1, zatímco u vektoru pEC-XT99A se bazální hladina exprese vůbec neprojeví.

5.2 Analýza populace buněk *C. glutamicum* exprimujících *gfpuv* z různých expresních vektorů

Expresní systémy mohou v rámci buněčné populace vykazovat nejednotnost v expresi genů a produkci proteinů. Může docházet k rozdělení populace buněk, kdy část buněk v populaci nevykazuje expresi cílového genu, a to i v případě, že je promotor řízen působením induktoru. Při použití expresního vektoru, např. pro produkci rekombinantních proteinů, je tento jev nežádoucí, a proto je třeba studovat homogenitu bakteriální populace.

Profil populace buněk *C. glutamicum* exprimujících *gfpuv* ze studovaných vektorů byl analyzován průtokovou cytometrií (vedoucí střediska cytometrie a mikroskopie MBÚ AV ČR, v. v. i.: RNDr. Jan Svoboda, Ph.D.). Jednotlivé kmeny *C. glutamicum* nesoucí konstrukty pECXT99A-*gfpuv*, pEKEx3-*gfpuv* a pCLTON1-*gfpuv* byly kultivovány v médiu 2xYT při 30 °C po dobu 24 h. Expresní vektory pEC-XT99A a pEKEx3 byly indukovány IPTG (0,5 mM) a vektor pCLTON1 tetracyklinem (250 ng/ml). Kmeny nesoucí prázdné vektory (bez genu *gfpuv*) byly použity jako kontrolní jednak bez přídavku, a jednak s přídavkem příslušných induktorů. Analýza průtokovou cytometrií byla provedena s použitím přístroje BD LSR II. Výsledky analýz buněčných populací kultur nesoucích jednotlivé vektory jsou dokumentovány na Obr. 14-16.



Obr. 14: Analýza exprese genu *gfpuv* v buňkách *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) průtokovou cytometrií.

Barevný shluk znázorňuje jednotlivé buňky (modrá – nejnižší koncentrace buněk, červená – nejvyšší koncentrace buněk). Osa x: čelní rozptyl (FSC-A; část A a E), nebo fluorescence (GFP-A; ostatní části; maximum emisní vlnové délky 525 nm, excitace 488 nm), osa y: boční rozptyl (SSC-A). Obrázky A) a E) – ohraničená oblast vyznačuje buňky kontrolních kmenů (čelní rozptyl). Ostatní části obrázku – ohraničení vymezuje oblast předpokládaného fluorescenčního signálu (fluorescence). Exprese *gfpuv* byla indukována přidavkem IPTG při $OD_{600} = 1$ (čas 0), vzorky kultur, indukované i neindukované, byly odebírány po 3, 6 a 24 h.

Z výsledků průtokové cytometrie uvedených na Obr. 14 vyplývá, že kmen *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) nevykazuje bazální expresi v neindukujících podmínkách (části Obr. 14 F, G, I, K). Potvrzení toho závěru je zřetelné z hodnot průměrné intenzity fluorescence v neindukujících podmínkách, které se téměř shodují

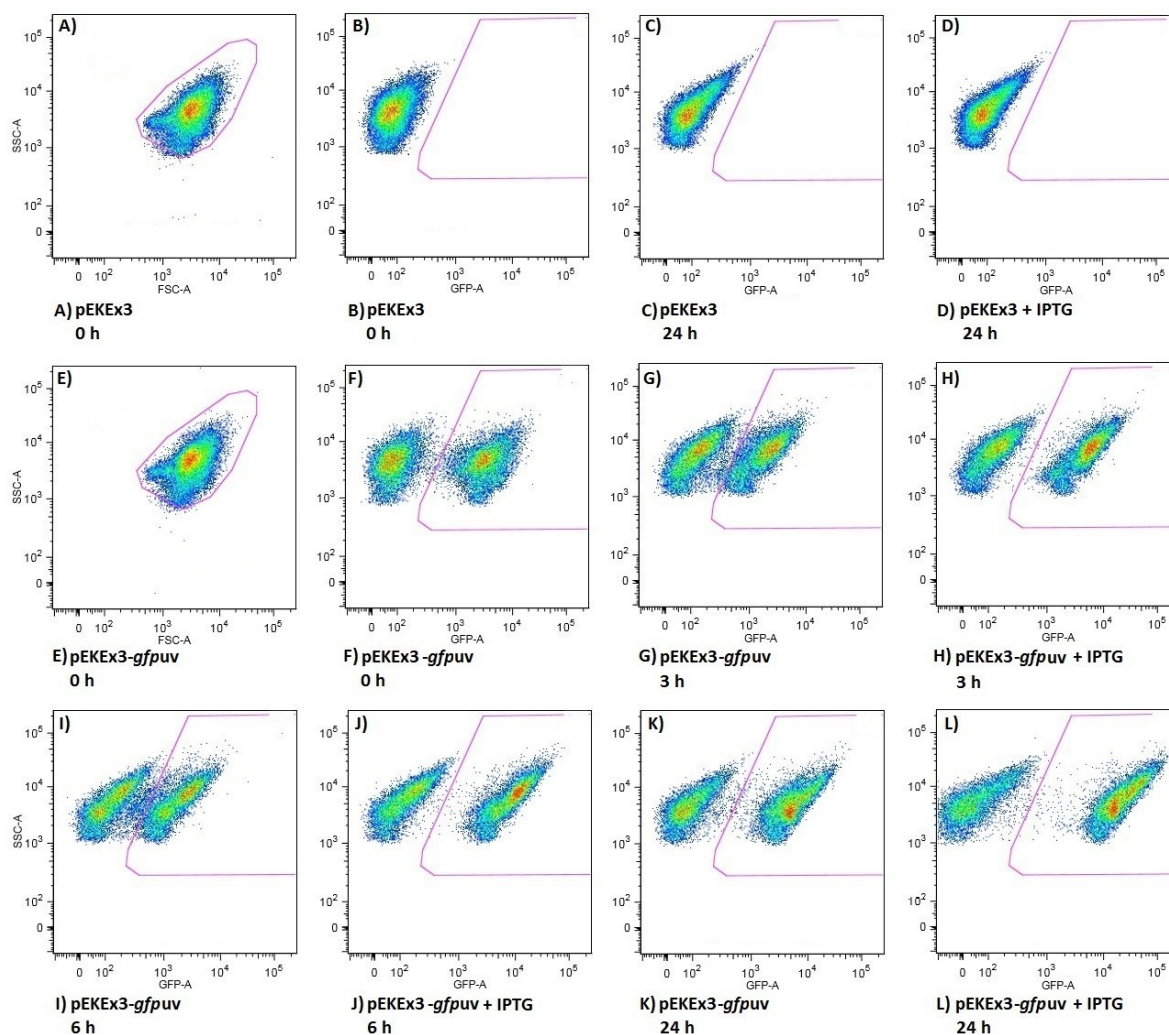
s hodnotami kontrolního prázdného vektoru (Tab. 6). Části Obr. 14 H, J a L ukazují, že u indukovaného vzorku kultury dochází v průběhu kultivace k mírnému zesílení fluorescence, jelikož je patrný posun signálu k vyšším hodnotám průměrné intenzity fluorescence. Intenzita fluorescence se po 24 h kultivace zvýšila přibližně 2,3x oproti hodnotě zjištěné po 3 h kultivace za přítomnosti IPTG (Tab. 6). Z Tab. 6 je též zřejmé, že po indukci působením IPTG převážná většina buněk *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) exprimovala gen *gfpuv*. Populace buněk je tedy z hlediska exprese genu vysoce homogenní.

Tab. 6: Analýza exprese genu *gfpuv* v buňkách *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) průtokovou cytometrií.

vzorek	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}
	0 h		3 h		6 h		24 h	
pEC-XT99A	75,5	0	136	0	144	0	121	0
pEC-XT99A + IPTG		0	142	0	133	0	116	0
pEC-XT99A- <i>gfpuv</i>	78,7	0,07	133	0,03	138	0,04	124	0,03
pEC-XT99A- <i>gfpuv</i> + IPTG			1180	88,9	1939	96,8	2711	98,9

^IPrůměrná intenzita fluorescence.

^{II}Procentuální zastoupení buněk vykazujících fluorescenční signál oproti negativní kontrole.



Obr. 15: Analýza exprese genu *gfpuv* v buňkách *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) průtokovou cytometrií.

Barevný shluk znázorňuje jednotlivé buňky (modrá – nejnižší koncentrace buněk, červená – nejvyšší koncentrace buněk). Osa x: čelní rozptyl (FSC-A; část A a E), nebo fluorescence (GFP-A; ostatní části; maximum emisní vlnové délky 525 nm, excitace 488 nm), osa y: boční rozptyl (SSC-A). Obrázky A) a E) – ohraničená oblast vyznačuje buňky kontrolních kmenů (čelní rozptyl). Ostatní části obrázku – ohraničení vymezuje oblast předpokládaného fluorescenčního signálu (fluorescence) na základě negativní kontroly. Expres *gfpuv* byla indukována přidávkem IPTG při $OD_{600} = 1$ (čas 0), vzorky kultur, indukované i neindukované, byly odebrány po 3, 6 a 24 h.

Z výsledku měření průtokové cytometrie *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*), zobrazeném na Obr. 15, vyplývá, že populace buněk tohoto kmene je značně heterogenní, jelikož signály poukazují na dvě subpopulace buněk. Jak v indukujících tak v neindukujících podmínkách (části Obr. 15 F-L) dochází k rozdělení populace, kdy část buněk produkuje protein Gfp a vykazuje fluorescenci zatímco druhá část nikoliv.

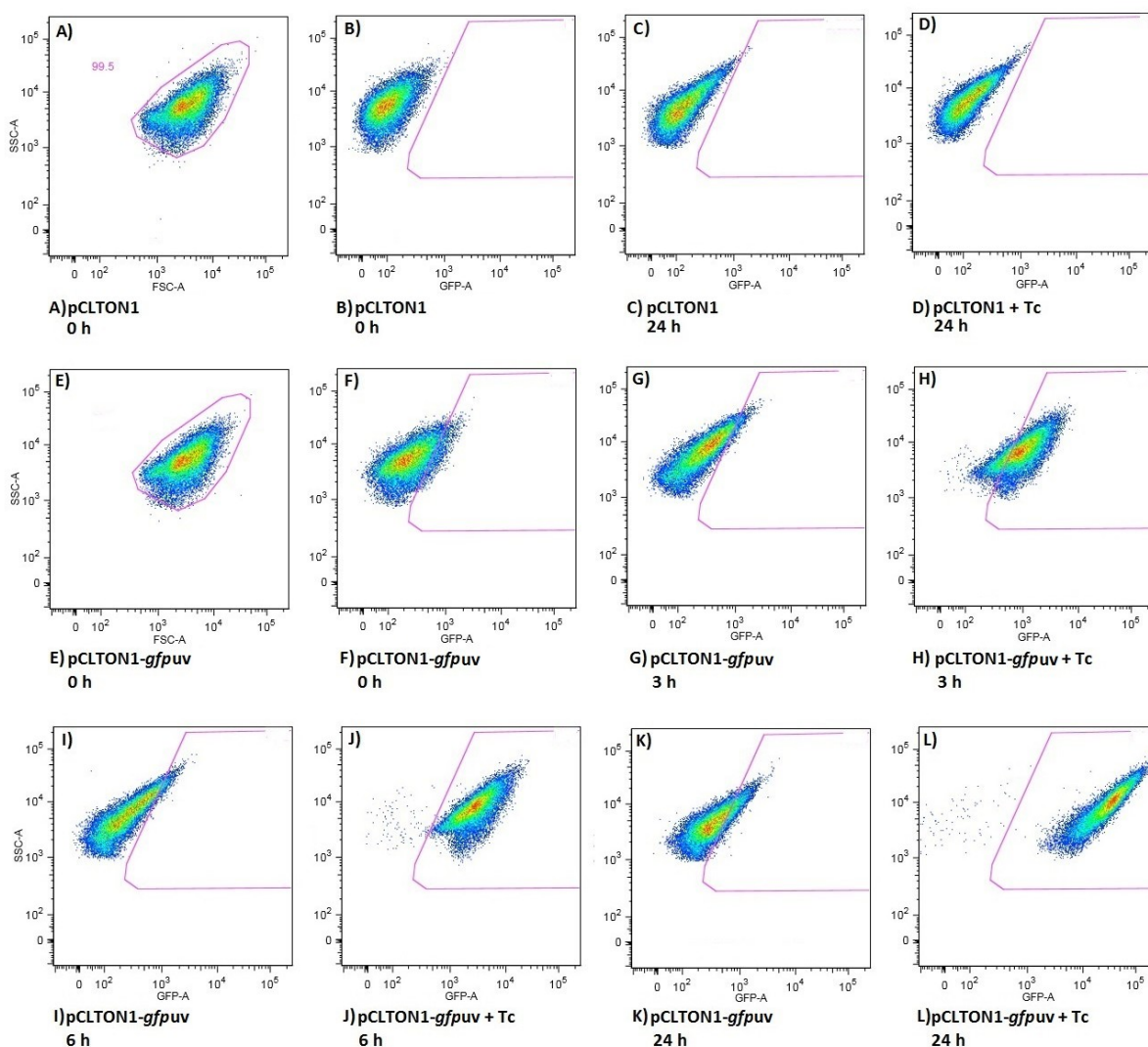
Toto zjištění potvrzují rovněž hodnoty uvedené v Tab. 7, z nichž vyplývá, že ve všech sledovaných časech kultivace pouze okolo 50 % populace vykazuje fluorescenční signál. Byla také prokázána výrazná bazální exprese v průběhu kultivace, což ukazuje výrazný shluk buněk ve vymezené oblasti fluorescence u vzorků kultury bez přidaného induktoru (části Obr. 15 F, G, I a K). Přesto je zřejmé, že se průměrná intenzita fluorescence během kultivace za přítomnosti IPTG zvyšuje, jak vyplývá z částí Obr. 15 H, J a L znázorňujících indukované vzorky kultury, kde je zřetelný posun shluku buněk k vyšším hodnotám intenzity fluorescence. Po 24 h kultivace došlo i ke značnému zvýšení intenzity bazální fluorescence, což je dokumentováno viditelným posunem signálu doprava u neindukovaného vzorku kultury. Intenzita fluorescence v neindukujících podmínkách se zvyšuje po 24 h kultivace přibližně trojnásobně oproti hodnotě po 3 h kultivace, zatímco v indukujících podmínkách dochází k nárůstu fluorescence až 5x (Tab. 7).

Tab. 7: Analýza exprese genu *gfpuv* v buňkách *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) průtokovou cytometrií.

vzorek	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp ⁺ (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp ⁺ (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp ⁺ (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp ⁺ (%) ^{II}
	0 h		3 h		6 h		24 h	
pEKEx3	88,3	0	143	0	134	0	112	0
pEKEx3 + IPTG			141	0	142	0	108	0
pEKEx3- <i>gfpuv</i>	2102	50,7	1149	48,1	1112	47,4	3684	56,4
pEKEx3- <i>gfpuv</i> + IPTG			3157	51,6	5280	52,7	15235	57,1

^IPrůměrná intenzita fluorescence.

^{II}Procentuální zastoupení buněk vykazujících fluorescenční signál oproti negativní kontrole.



Obr. 16: Analýza exprese genu *gfpuv* v buňkách *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) průtokovou cytometrií.

Barevný shluk znázorňuje jednotlivé buňky (modrá – nejnižší koncentrace buněk, červená – nejvyšší koncentrace buněk). Osa x: čelní rozptyl (FSC-A; část A a E)), nebo fluorescence (GFP-A; ostatní části; maximum emisní vlnové délky 525 nm, excitace 488 nm), osa y: boční rozptyl (SSC-A). Obrázky A) a E) – ohraničená oblast vyznačuje buňky kontrolních kmenů (čelní rozptyl). Ostatní části obrázku – ohraničení vymezuje oblast předpokládaného fluorescenčního signálu (fluorescence). Exprese *gfpuv* byla indukována přidáním tetracyklinu (Tc) při $OD_{600} = 1$ (čas 0), vzorky kultur, indukované i neindukované, byly odebrány po 3, 6 a 24 h.

Z výsledků průtokové cytometrie kmene *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) uvedených na Obr. 16 vyplývá, že tento vektor vykazuje slabou bazální expresi v neindukujících podmínkách. V částech Obr. 16 F, G, I a K znázorňujících vzorek kultury bez přidání induktoru je viditelný okraj shluku buněk překračující hranici, která

vymezuje oblast fluorescence oproti negativní kontrole. Hladina bazální exprese je však maximálně 2,5x vyšší v porovnání s kontrolním kmenem obsahujícím prázdný vektor a nejvýše u 16,4 % buněk dochází k této bazální expresi (viz Tab. 8). U indukovaného vzorku kultury znázorněného v částech Obr. 16 H, J a L lze v jednotlivých časech pozorovat znatelný posunem signálu doprava, což odpovídá výrazně se zvyšující průměrné intenzitě fluorescence. Od 3. do 24. h se průměrná intenzita fluorescence zvýšila přibližně 31x (Tab. 8). Z tab. 8 je též zřejmé, že po indukci působením tetracyklinu převážná většina buněk *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) exprimovala gen *gfpuv*, tudíž populace je z hlediska exprese genu vysoce homogenní.

Tab. 8: Analýza exprese genu *gfpuv* v buňkách *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) průtokovou cytometrií.

vzorek	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}	Signál Gfp ^I	Buňky Gfp + (%) ^{II}
	0 h		3 h		6 h		24 h	
pCLTON1	117	0	178	0	153	0	161	0
pCLTON1 + Tc			111	0	121	0	143	0
pCLTON1- <i>gfpuv</i>	297	6,95	349	3,82	324	4,36	411	16,4
pCLTON1- <i>gfpuv</i> + Tc			1158	79,3	3415	99,5	36015	99,6

^IPrůměrná intenzita fluorescence.

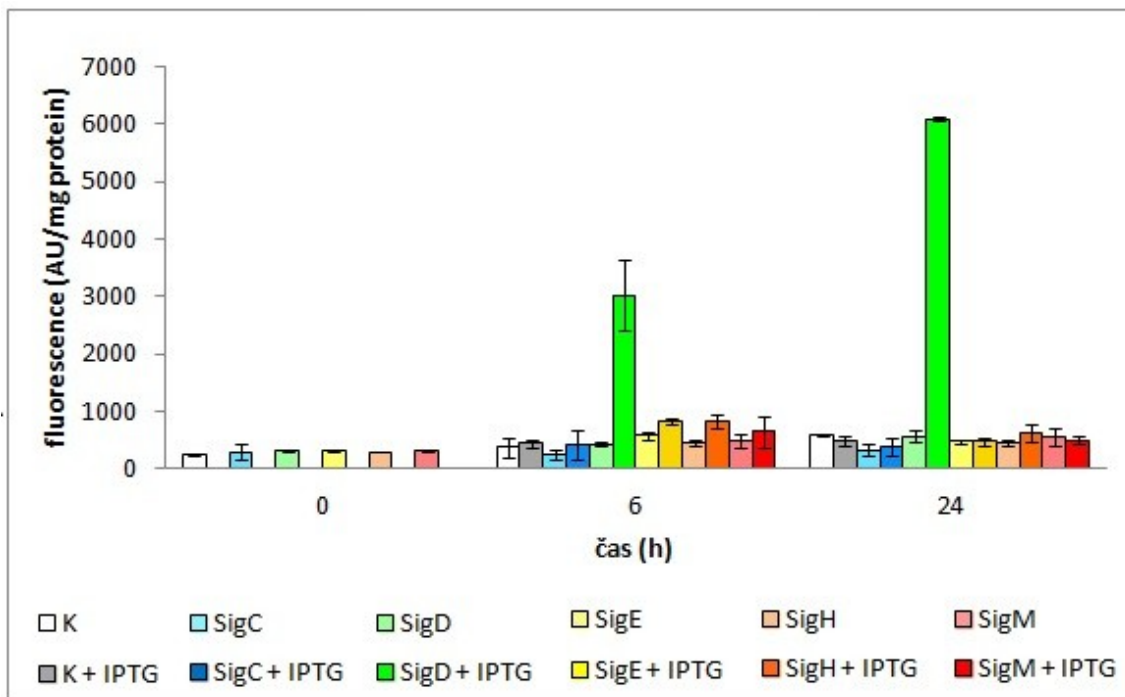
^{II}Procentuální zastoupení buněk vykazujících fluorescenční signál oproti negativní kontrole.

5.3 Zjištění závislosti promotoru *Pcg0420* na faktoru σ

Promotory genů lze klasifikovat podle toho, který faktor σ je jako součást RNA polymerasy rozeznává a umožňuje tak zahájení transkripce. Jedna z metod, které takové přiřazení stanoví, využívá biplasmidový systém, v němž expresní vektor zajišťuje nadprodukcí určitého faktoru σ a reportérový gen promotor-test vektoru umožňuje detekci aktivity testovaného promotoru (Rezuchova a Kormanec, 2001). Jedním z cílů analýzy vlastností expresních vektorů v této práci bylo vybrat jeden z nich pro tento systém v *C. glutamicum*. Na základě výsledků měření genové exprese (kapitola 5.1.2, 5.1.3) a průtokové cytometrie (kapitola 5.2) byl k „optimální“ nadprodukcí faktorů sigma pro výše uvedený testovací dvouplasmidový systém vybrán vektor pEC-XT99A.

Promotor, jenž měl být tímto způsobem analyzován, byl vybrán podle předběžných informací o skupině promotorů, které jsou zřejmě rozeznávány dosud nestudovaným faktorem σ^D (Kalinowski, ústní sdělení). Promotor genu *cg0420* (kódující hypotetický protein) byl vložen do promotor-test vektoru pEPR1, čímž byla vytvořena transkripční fúze mezi promotorem *Pcg0420* a reportérovým genem *gfpuv* (Rucká, nepublikováno). Aktivita promotoru byla zjišťována na základě produkovaného proteinu Gfpuv, přičemž množství tohoto proteinu bylo měřeno intenzitou fluorescence.

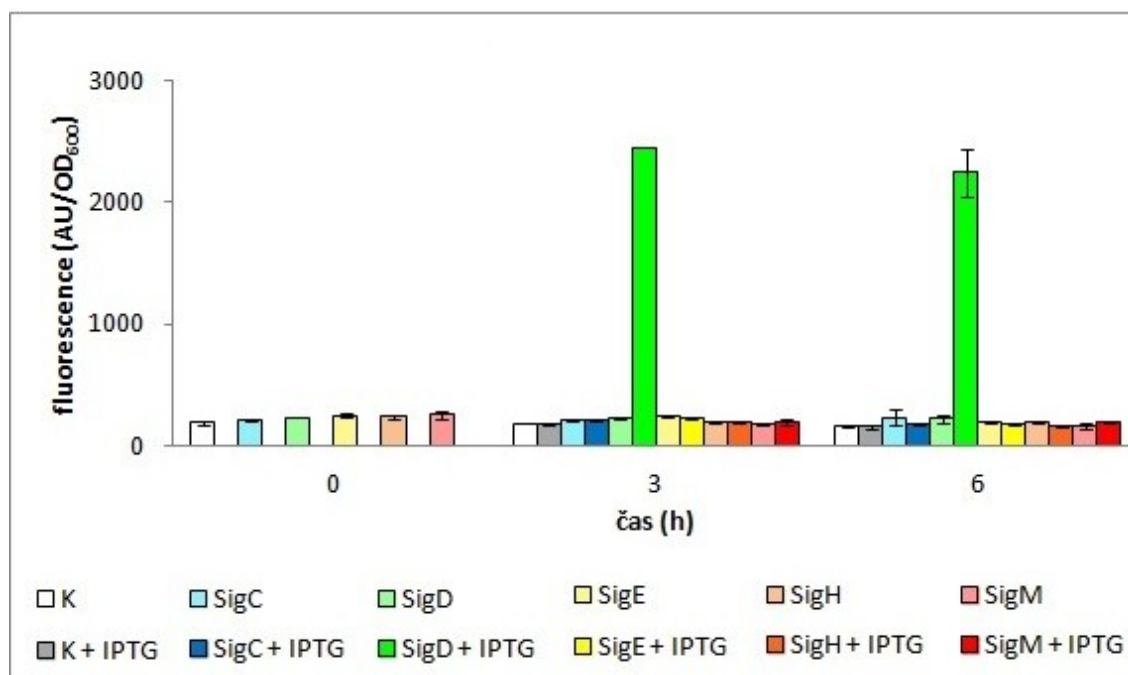
Jako optimální vektor, pro vytvoření biplasmidového systému spolu s promotor-test vektorem pEPR1, byl tedy vybrán expresní vektor pEC-XT99A, nesoucí vždy jeden z genů pro faktory σ typu ECF (*sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH* a *sigM*) a spolu s výše uvedeným plasmidovým konstruktem pEPR1-*Pcg0420* byl postupně transformován kmen *C. glutamicum* ATCC 13032. Následně byla u všech takto získaných dvouplasmidových systémů měřena intenzita fluorescence v bezbuněčném extraktu (Obr. 17) a také intenzita fluorescence celých buněk (Obr. 18). Během tohoto fluorescenčního experimentu byla navíc poprvé testována metoda kultivace biplasmidových kmenů *C. glutamicum* v malých objemech (2 ml) v kultivačních destičkách Nunclon[®] Multidishes 12, aby se prokázala její potenciální použitelnost pro další experimenty stanovování závislosti promotorů na faktorech σ . Pro oba typy měření (bezbuněčný extrakt; celé buňky) byly kultury indukovány 0,5 mM IPTG. Pro stanovení pozadí měření fluorescence byla stanovována fluorescence i u kmene obsahujícího prázdný vektor pEC-XT99A (bez genu pro faktor σ).



Obr. 17: Aktivita promotoru v závislosti na faktoru σ v biplasmidovém systému *C. glutamicum*(pEPR1/pEC-XT99A) při použití bezbuněčného extraktu.

Kultivace probíhaly v komplexním médiu 2xYT, exprese genů pro faktory σ byla indukována přidavkem IPTG v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence extraktu buněk *C. glutamicum* s plasmidem pEPR1-Pcg0420 a konstrukty pEC-XT99A s jednotlivými faktory σ , bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmeny (K; buňky s prázdným vektorem pEC-XT99A a plasmidem pEPR1-Pcg0420). Znázorněný výsledek je průměrem ze tří nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je zobrazena chybovou úsečkou.

Z výsledků uvedených na Obr. 17 vyplývá, že promotor Pcg0420 je aktivní jen při indukované expresi genu *sigD*, tudíž byla prokázána striktní závislost tohoto promotoru na faktoru σ^D .



Obr. 18: Aktivita promotoru v závislosti na faktoru σ v biplasmidovém systému *C. glutamicum*(pEPR1/pEC-XT99A) při použití celých buněk.

Kultivace probíhala v kultivačních destičkách ve 2 ml komplexního média 2xYT, exprese genů pro faktory σ byla indukována přidavkem IPTG v čase 0. Barevné sloupce znázorňují intenzitu fluorescence buněk *C. glutamicum* s plasmidem pPEPR1-*Pcg0420* a konstrukty pEC-XT99A s jednotlivými faktory σ , bílé a šedé sloupce znázorňují hodnoty pro kontrolní kmen (K; buňky s prázdným vektorem pEC-XT99A a plasmidem pEPR1-*Pcg0420*). Znárodný výsledek je průměrem ze tří nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je zobrazena chybovou úsečkou.

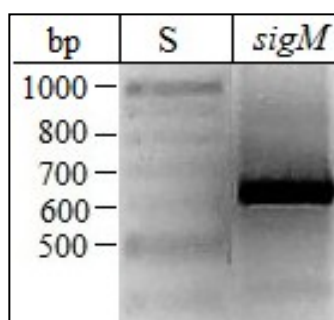
Potvrzení striktní závislosti promotoru *Pcg0420* na faktoru σ^D dokazuje Obr. 18, kde se také projevuje aktivita promotoru *Pcg0420* působením faktoru σ^D . Výsledek měření s použitím celých buněk odpovídá výsledku měření bezbuněčného extraktu.

5.4 Použití expresního vektoru pMKEx2 pro produkci proteinu v kmeni *C. glutamicum* MB001

Expresní vektory slouží k produkci a purifikaci potřebných proteinů. Pro produkci proteinů v *C. glutamicum* byl vytvořen speciální expresní systém z hostitelského kmene *C. glutamicum* MB001 a expresního vektoru pMKEx2 (Kortmann *et al.*, 2015).

5.4.1 Klonování genu *sigM* v expresním vektoru pMKEx2

Plasmid pET22b-*sigM* byl izolován z *E. coli* a sloužil jako templát pro PCR. PCR amplifikace fragmentu nesoucího gen *sigM* byla provedena pomocí kombinace primerů SIGMPMKEXR + SIGMPMKEXF a GoTaq[®] DNA polymerasy. PCR reakce probíhala za teploty nasedání primerů $T = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$, v objemu 100 μl . Ověření výsledku

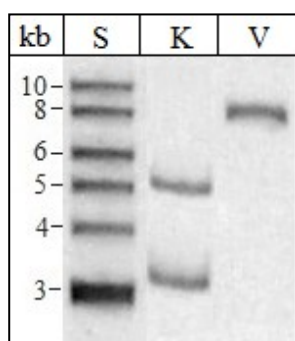


PCR reakce elektroforézou v 1,5% agarosovém gelu (Obr. 19) potvrdilo očekávanou velikost amplifikovaného fragmentu. Konce amplifikovaného fragmentu nesoucího celý strukturní gen *sigM* obsahovaly restrikční místa pro enzymy *AvrII* a *NcoI* a štěpením PCR fragmentu těmito enzymy byly vytvořeny komplementární konce pro ligaci do vektoru pMKEx2.

Obr. 19: PCR genu *sigM*.

S: standard 100 bp, *sigM*: produkt PCR reakce (velikost fragmentu *sigM* 634 bp).

Vektor pMKEx2 byl izolován z *E. coli* a štěpen restrikčními endonukleasami *AvrII* a *NcoI*. Následně byl výše uvedený insert ligován do vektoru a ligační směsí byly transformovány buňky *E. coli*. Z narostlých klonů selektovaných na 2xYT miskách s kanamycinem byla izolována plasmidová DNA, která byla poté štěpena restrikční endonukleasou *XhoI* pro prokázání přítomnosti klonovaného insertu v odpovídající velikosti. Pomocí elektroforézy v 0,7% agarosovém gelu byla na základě restrikční mapy potvrzena správná velikost štěpených fragmentů vytvořeného konstruktu (Obr. 20). Specifičnost klonování byla ověřována i PCR reakcí s použitím kombinace primerů T7TP + SIGM, při $T_m = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následným vyhodnocením elektroforézou v 1,5% agarosovém gelu. Identita nukleotidové sekvence insertu v plasmidové DNA byla definitivně potvrzena stanovením nukleotidové sekvence za použití primeru T7TP (analýza provedena firmou BIOGEN PRAHA s.r.o.). Vytvořený konstrukt byl následně



použit pro transformaci buněk *C. glutamicum* kmene MB001 a transformanti byli opět selektováni na 2xYT miskách s kanamycinem. Pro ověření přítomnosti konstrukt pMKEx2-*sigM* v *C. glutamicum* MB001 byla izolována plasmidová DNA. Potvrzený klon byl použit pro následnou expresi genu *sigM* a produkci proteinu σ^M .

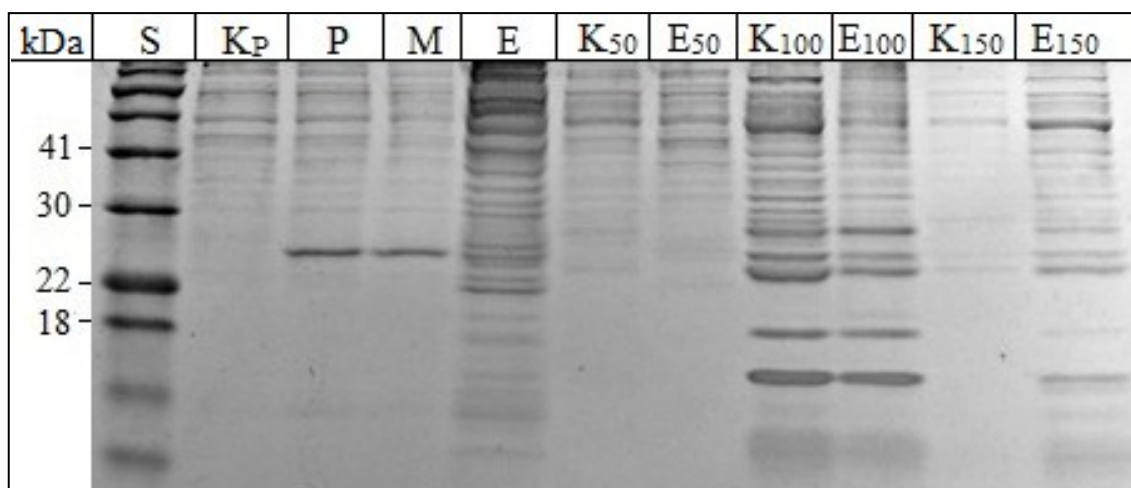
Obr. 20: Ověření konstrukt pMKEx2-*sigM*.

S: standard 1 kb, K: konstrukt pMKEx2-*sigM* štěpený restrikční endonukleasou *XhoI* (předpokládaná velikost restrikčních fragmentů 3,332 a 5,190 kb), V: prázdný vektor pMKEx2 linearizovaný restrikční endonukleasou *XhoI* (velikost 8,061 kb).

5.5 Izolace proteinu σ^M

Zkonstruovaný expresní systém *C. glutamicum* MB001(pMKEx2-*sigM*) byl použit pro indukcii exprese genu *sigM* pomocí 0,1 mM IPTG během kultivace v komplexním médiu 2xYT. Po kultivaci byl protein σ^M izolován afinitní chromatografií prostřednictvím histidinové kotvy a přítomnost rozpustné formy proteinu SigM byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Z výsledku uvedeného na Obr. 21 je patrný jasný pás ve vzorku peletu v odpovídající velikosti 25 kDa. Lze tedy konstatovat, že protein SigM byl produkován v relativně velkém množství, ale většina proteinu SigM byla v nerozpustné formě (rozpustná forma proteinu nebyla v bezbuněčném extraktu detekovatelná). Proto byla provedena kultivace s komerční soupravou EnPresso® B umožňující vysokou produkci rekombinačních proteinů, při které byla exprese genu *sigM* indukována 0,02 mM IPTG, avšak výsledek byl srovnatelný, a proto není uveden.

Pro ověření přítomnosti proteinu SigM byl z polyakrylamidového gelu vyříznut pás ze vzorku peletu v oblasti korespondující s velikostí 25 kDa, následovalo štěpení výřezu gelu trypsinem a analýza pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (analýzu provedl Ing. Petr Halada, Ph.D, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.). Protein byl identifikován přítomností 4 peptidů, které pokrývaly 46% sekvence proteinu σ^M , tudíž tato analýza prokázala výskyt nadprodukovaného proteinu σ^M z *C. glutamicum*.



Obr. 21: SDS-PAGE analýza expresního systému *C. glutamicum*(pMKEx2-*sigM*) a proteinové frakce získané afinitní chromatografií.

Kultivace probíhala v komplexním médiu 2xYT, exprese genu kódujícího protein SigM byla indukována 0,1 mM IPTG. Jednotlivé frakce byly eluovány různou koncentrací imidazolu (50-150 mM). S: proteinový standard, K_p: kontrolní kmen - pelet buněk *C. glutamicum*(pMKEx2), P: pelet buněk *C. glutamicum*(pMKEx2-*sigM*), M: pelet buněk *C. glutamicum*(pMKEx2-*sigM*) denaturovaný 8 M močovinou, E: bezbuněčný extrakt *C. glutamicum*(pMKEx2-*sigM*), K₅₀-K₁₅₀: kontrolní kmen *C. glutamicum*(pMKEx2) – po eluci imidazolem (50-150 mM), E₅₀-E₁₅₀: bezbuněčný extrakt *C. glutamicum*(pMKEx2-*sigM*) po eluci imidazolem (50-150 mM).

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo popsat některé vlastnosti expresních vektorů pro *C. glutamicum* a použít vybrané vektory v experimentech, které by poskytly výsledky o vztazích konkrétních promotorů a faktorů sigma (σ) RNA polymerasy *C. glutamicum*. Podařilo se vybrat expresní vektor (pEC-XT99A) vhodný pro přiřazení faktoru σ k promotoru, který je daným faktorem σ rozeznáván, a stanovit také optimální podmínky pro tento test *in vivo*. V druhé části této práce expresní vektor pMKEx2 určený pro izolaci a purifikaci proteinů v *C. glutamicum* sice umožnil účinnou produkci proteinu σ^M , ale podobně jako při heterologní expresi genu *sigM* v *E. coli* byla většina proteinu přítomna v inkluzích, tedy v nerozpustné formě. Proto nemohl být vzniklý protein σ^M použit pro transkripci *in vitro*, jak bylo původně zamýšleno.

6.1 Porovnání exprese genu *gfpuv* z expresních vektorů pEC-XT99A, pEKEEx3 a pCLTON1

Zjistilo se, že se tři testované expresní vektory liší svými vlastnostmi při produkci modelového proteinu Gfpuv, který mohl být snadno detekován a kvantifikován pomocí intenzity fluorescence. Vektory se lišily v míře exprese modelového (reportérového) genu, v míře bazální exprese bez přidání induktoru (“leaky exprese”), v závislosti genové exprese na koncentraci induktoru a v homogenitě populace buněk z hlediska exprese klonovaného genu. Kmen *C. glutamicum* nesoucí konstrukt na základě vektoru pEC-XT99A (Kirchner a Tauch, 2003) nevykazoval prakticky žádnou bazální expresi genu *gfpuv* (Obr. 7 a 8), ale produkce reportérového proteinu byla relativně nízká oproti dalším dvěma vektorovým konstruktům (Obr. 13). Kromě nejnižší koncentrace induktoru IPTG (0,05mM) byla exprese při použití ostatních koncentrací IPTG po 24 h téměř shodná. Dá se tedy říci, že induktor u tohoto vektoru vyvolává odpověď “vše nebo nic”. Pro plnou indukci tedy postačovala koncentrace IPTG 0,1 mM. Takové chování expresního systému (*all-or-none induction*) bylo popsáno u promotoru *Plac* a jeho derivátů *Ptac* a *Ptrc* (Lee a Liao, 2008). Stupňovanou genovou expresí, která je úměrná koncentraci induktoru IPTG je možno zajistit vložením expresní kazety do chromosomu, tedy tak, aby byla přítomna jen v jedné kopii, a klonováním genu pro represor LacIQ v mnohakopiovém plasmidu (Lee a Liao, 2008). Expresi “vše nebo nic” projevuje také promotor *ParaBAD*, kde proteinový transportér induktoru (arabiny) je také indukován arabinosou a způsobuje autokatalýzu (Khlebnikov *et al.*, 2000).

Stupňovanou expresi závislou na koncentraci induktoru zajistili autoři tím, že geny transportního systému (*araE* a *araFGH*) exprimovali z jiného, konstitutivního promotoru (Khlebnikov *et al.*, 2000). Podle výsledků průtokové cytometrie exprimují gen *gfpuv* prakticky všechny buňky (Tab. 6). Populace buněk *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) byla tedy z hlediska produkce Gfpuv homogenní. Pro naše účely, tedy expresi genu kódujícího faktor σ z *C. glutamicum* a spuštění transkripce z testovaných promotorů tímto faktorem, může být tato vlastnost expresního systému závislého na vektoru pEC-XT99A výhodná.

Kmen *C. glutamicum* nesoucí konstrukt na základě vektoru pEKEx3 (Hoffelder *et al.*, 2010) s promotorem *P_{trc}* vykazoval velmi výraznou bazální expresi genu *gfpuv*. V tom byly výsledky měření míry exprese (Obr. 9 a 10) shodné s daty analyzovanými průtokovým cytometrem (Obr. 15 F, G, I a K; Tab. 7). Inducibilní promotory vykazují často bazální expresi i bez přídavku induktoru (Kang *et al.*, 2014), která může být potlačena silným represorem (Blokpoel *et al.*, 2014). Z tohoto hlediska není pEKEx3 vhodný např. v případech, kdy produkovaný protein má toxické účinky a kde je proto vyžadována řízená exprese genu (Parikh *et al.*, 2013). Produkce reportérového proteinu Gfpuv z pEKEx3 byla ze tří expresních vektorů nejvyšší nebo srovnatelná s vektorem pCLTON1. Tento vektor by tedy mohl být užitečný v případech, když exprese *sig* genů během růstu kultury je poměrně vysoká (např. u *sigA* nebo *sigB*) a expresí genu z vektoru ji chceme výrazně zvýšit. Podobně jako vektor pEC-XT99A také pEKEx3 projevoval expresi “vše nebo nic“ (Obr. 9 a 10), ale podle výsledků průtokové cytometrie jen asi polovina buněk vykazovala fluorescenci (Obr. 15 H, J a L a Tab. 7). Vysoká bazální exprese a heterogenita buněčné populace se tedy jeví jako hlavní nevýhody vektoru pEKEx3.

Bazální exprese kmene *C. glutamicum* nesoucí konstrukt na základě vektoru pCLTON1 byla velmi nízká (Obr. 11 a 13). Promotor *P_{tet}* je tedy v nepřítomnosti induktoru (Tc) silně reprimován, jak bylo již dříve popsáno (Lausberg *et al.*, 2012). Produkce Gfpuv byla po indukci tetracyklinem podobně vysoká jako u vektoru pEKEx3 (Obr. 13), ovšem s tím rozdílem, že gen *gfpuv* exprimovaly prakticky všechny buňky a populace buněk byla tedy homogenní (Obr. 16). Na rozdíl od dvou předchozích vektorů však pCLTON1 vykazoval stupňovanou expresi, tedy intenzita fluorescence byla závislá na koncentraci induktoru Tc, což se projevilo zvláště při kultivaci v komplexním médiu. Podobně se při kultivaci *C. glutamicum* s konstruktem na základě pCLTON1 v bohatém médiu BHI projevovala zvyšující se intenzita exprese

klonovaného genu v závislosti na koncentraci induktoru (Lausberg *et al.*, 2012). Tento vektor je tedy vhodný zvláště v případech, kdy chceme koncentrací induktoru měnit expresi cílového genu.

Pro účely použití expresního vektoru v biplasmidovém systému, v němž druhým plasmidem je promotor-test vektor pEPR1 nesoucí zkoumaný promotor se jeví jako nejvhodnější pEC-XT99A. Vektory pEC-XT99A a pEPR1 jsou sice zkonstruovány na základě příbuzných replikonů pGA1 (Nešvera *et al.*, 1997) a pSR1 (Kirchner a Tauch, 2003), a jsou tedy inkompatibilní, ale díky selekčnímu tlaku pomocí rozdílných markerů pro determinanty rezistence (pECXT99A – Tc a pEPR1 – Km) je lze oba udržet v jedné buňce *C. glutamicum*. Podle elektroforetické analýzy izolovaných plasmidových DNA (data neuvedena) se dokonce zdá, že jejich inkompatibilita je výhodou, protože zřejmě vzhledem k podobné velikosti vektorů jsou buňkami udržovány v přibližně stejném počtu kopií. Vektor pEC-XT99A sice zajišťuje nižší expresi než další dva zkoumané vektory, ale je možné, že není nutná přítomnost regulačního proteinu σ ve velkém množství, zvláště v případě stresových faktorů sigma (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M), které jsou za optimálních podmínek v exponenciální fázi růstu pravděpodobně v buňce ve velmi nízké koncentraci. Pro další experimenty počítáme i s použitím vektoru pCLTON1, který však nese jako marker gen pro rezistenci vůči Km stejně jako pEPR1. Pro použití v biplasmidovém systému bude proto třeba ve vektoru pCLTON1 zaměnit determinantu rezistence.

6.2 Průtoková cytometrie populace buněk *C. glutamicum*

Průtoková cytometrie, která zkoumá vlastnosti buněčných kultur na úrovni jednotlivých buněk, může odhalit jejich vlastnosti, které při měření kultury jako celku není možné zjistit. Z výsledků průtokové cytometrie je zřejmé, že zatímco kmeny *C. glutamicum* nesoucí plasmidy pEC-XT99A-*gfpuv* či pCLTON1-*gfpuv* jsou z hlediska exprese genu *gfpuv* homogenní, jen asi polovina populace buněk kmene *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) vykazuje po indukci měřitelnou fluorescenci. Je známo, že bakteriální populace tvoří subpopulace i ve fyziologickém stavu, v němž bychom očekávali stejnou reakci všech buněk kultury. Např. při utilizaci methanolu prostřednictvím methanolem indukovaného promotoru *Pmx_αF* se populace buněk *Methylobacterium extorquens* rozdělila na 3 subpopulace, přičemž jedna z nich na změnu zdroje uhlíku nereagovala (Strovas a Lidstrom, 2009). Podobně při expresi genu

amyM ze silného promotoru *P(amyQ)-M* byla pozorována heterogenita populace buněk *Bacillus subtilis* v produkci α -amylasy (Ploss *et al.*, 2016). Příčina heterogenity populace buněk *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) nám není známá. Celková exprese genu *gfpuv* byla i přesto velmi silná. Další vlastnosti zkoumaných expresních systémů, tedy bazální hladina exprese, míra indukované exprese a závislost exprese na koncentraci induktoru, zjištěné jednak měřením exprese, jednak průtokovou cytometrií se velmi dobře shodovaly.

6.3 Závislost promotoru *Pcg0420* na faktoru σ

Na základě předchozích studií a zjištěných vlastností zkoumaných expresních vektorů byl vybrán vektor pEC-XT99A pro expresi genů kódujících alternativní faktory σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M a nalezení faktoru σ , který jako součást RNA polymerasy umožňuje transkripci z promotoru *Pcg0420*. Tento promotor řídí transkripci jednoho z genů, jejichž exprese byla u divokého kmene *C. glutamicum* vyšší než u kmene s delecí v genu *sigD*. Tento výsledek, zjištěný analýzou na úrovni transkriptomu, naznačoval, že iniciace transkripce z promotoru *Pcg0420* je spouštěna RNA polymerasou za účasti ECF faktoru σ^D (Kalinowski, ústní sdělení). Rozhodli jsme se toto mínění ověřit v biplasmidovém systému, kde v expresním vektoru je gen pro faktor σ a promotor-test vektor s reportérovým genem *gfpuv*, který nese zkoumaný promotor. Podle předběžných výsledků obsahuje *sigD*-regulon geny se vztahem k syntéze buněčné stěny a mykolových kyselin, které jsou klíčovou složkou povrchové hydrofobní vrstvy buněk *C. glutamicum*. Faktor σ^D se tedy pravděpodobně podílí na aktivaci genů zapojených v odpovědi na povrchový stres. Konvenční sekvence -10 a -35 předpokládaných σ^D -závislých promotorů se výrazně liší od sekvencí promotorů vegetativních genů (σ^A -závislých) (Pátek a Nešvera, 2011) i genů přechodné a stacionární fáze (σ^B -závislých) (Larisch *et al.*, 2007), a proto byly pro tento test použity pouze ECF faktory σ . Měření fluorescence extraktu biplasmidových buněk jasně prokázalo, že promotor *Pcg0420* je rozeznáván faktorem σ^D (Obr. 17). Vzhledem k tomu, že výsledek byl tak jednoznačný, testovali jsme na tomto systému použití i jednodušší a rychlejší metody stanovení této závislosti. Metoda spočívá v paralelní kultivaci tří identických sad biplasmidových kmenů v kultivačních destičkách a měření fluorescence přímo v buňkách. Podobný postup byl také použit pro přiřazování promotoru a faktorů σ z mnoha bakterií, s tím rozdílem, že vyhodnocení bylo provedenou průtokovou

cytometrií (Rhodius *et al.*, 2013). I tento postup jednoznačně potvrdil, že promotor je σ^D -závislý (Obr. 18). Tento zjednodušený postup bude možné pravděpodobně použít pro specifické faktory σ , kde rozdíl ve fluorescenci kontrolních kmenů a kmenů exprimujícím příslušný faktor σ je výrazný.

6.4 Exprese genu *sigM* a izolace proteinu σ^M

Systém transkripce *in vitro* pro *C. glutamicum* vyžaduje izolaci a purifikaci jádra RNA polymerasy a sedmi jednotlivých faktorů σ (Holátko *et al.*, 2012). Zatímco šest faktorů σ z *C. glutamicum* bylo v rozpustné formě izolováno pomocí heterologního expresního systému založeného nahostitelském kmeni *E. coli*, jediný faktor σ^M se koncentroval v inkluzích a byl vždy detekován v peletu (Holátko, nepublikováno). Produkce nerozpustného cizorodého proteinu v *E. coli* je poměrně častá (Sørensen a Mortensen, 2005). Rozpustný protein σ^M se podařilo získat denaturací nerozpustné formy a šetrnou renaturací. V žádném z pokusů transkripce *in vitro*, ve kterých byl využit tento protein σ^M , se však nepodařilo získat produkt transkripce (Holátko, nepublikováno). Na základě těchto zkušeností jsme se pokusili o produkci rozpustného proteinu σ^M homologní expresí v *C. glutamicum*. K tomu je vhodný expresní vektor pMKEx2, který nese promotor PT7 a spolu s kmenem *C. glutamicum* MB001, který obsahuje v chromosomu gen kódující T7 polymerasu (Kortmann *et al.*, 2015), tvoří expresní systém analogický expresnímu systému z *E. coli* využívajícího vektory řady pET. Měřením míry exprese bylo prokázáno, že exprese z promotoru PT7 v *C. glutamicum* je 3,5x silnější než u jiných expresních vektorů, nesoucích promotor *P_{tac}* (Kortmann *et al.*, 2015). Ani s použitím tohoto homologního expresního systému se však rozpustný protein σ^M nepodařilo získat. Po rozpuštění silného pásu peletu z polyakrylamidového gelu byl hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF) protein σ^M identifikován. Různé úpravy postupu kultivace a exprese genu *sigM*, jako kultivace ve speciálním produkčním médiu EnPresso B, použití nízké koncentrace induktoru a kultivace při 16 °C po dobu 24 h, množství rozpustného proteinu však nezvýšily. U vektoru pMKEx2 byla za použití průtokové cytometrie prokázána 99% homogenita populace při produkci fluorescenčního proteinu (Kortmann *et al.*, 2015). Vektor pMKEx2 proto využijeme pro testování izolace a purifikace dalších proteinů z *C. glutamicum*.

7 Souhrn

V této diplomové práci jsem studovala vlastnosti expresních vektorů pEC-XT99A-*gfpuv*, pEKEx3-*gfpuv* a pCLTON1-*gfpuv* při expresi modelového proteinu *gfpuv* v *Corynebacterium glutamicum*, přičemž míra exprese byla měřena intenzitou fluorescence. Také jsem stanovovala aktivitu promotoru *Pcg0420* působením faktorů sigma (σ). Dále jsem ověřovala, zda izolaci proteinu SigM po expresi genu *sigM* z vektoru pMKEx2-*sigM* v *C. glutamicum* bude získána rozpustá forma tohoto proteinu. V této práci jsem dospěla k následujícím výsledkům:

- Kmeny *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) a *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) při kultivaci v závislosti na množství induktoru dosahovaly spíše exprese „vše nebo nic“, zatímco u *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) byla prokázána stupňovaná exprese.
- Zvýšená míra exprese se projevuje při kultivaci v minimálním médiu u kmenů *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) a *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*).
- Souběžnou kultivací všech kmenů se ukázalo, že nejsilnější exprese dosahuje kmen s vektorem pEKEx3 a naopak nejslabší vektor, co do míry exprese, je pEC-XT99A.
- Vysoká hladina bazální exprese (bez induktoru) se projevila u kmene *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*), zatímco u kmene *C. glutamicum*(pCLTON1-*gfpuv*) byla jen mírně zvýšena. U kmene *C. glutamicum*(pEC-XT99A-*gfpuv*) nebyla bazální exprese zjištěna.
- Heterogenita populace byla prokázána u kmene *C. glutamicum*(pEKEx3-*gfpuv*) a kmeny nesoucí ostatní vektory byly z hlediska exprese genu *gfpuv* homogenní.
- Bylo dokázáno, že promotor *Pcg0420* je σ^D -závislý.
- Exprese genu *sigM* z kmene *C. glutamicum*(pMKEx2-*sigM*) prokázala přítomnost jeho proteinového produktu SigM v inkluzích, ale nebylo možné izolovat tento protein v jeho rozpustné formě.

8 Seznam citované literatury

- Anthony, J. R., Anthony, L. C., Nowroozi, F., Kwon, G., Newman, J. D., Keasling, J. D. (2009): Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. *Metabolic Engineering*, 11(1), 13-19.
- Barák, I., Koptides, M., Jucovič, M., Šišová, M., Timko, J. (1990): Construction of a promoter-probe shuttle vector for *Escherichia coli* and *Brevibacterium*. *Gene*, 95, 133-135.
- Barreiro, C., González-Lavado, E., Pátek, M., Martin, J. F. (2004): Transcriptional analysis of the groESgroEL1, groEL2, and dnaK genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *Journal of Bacteriology*, 186, 4813-4817.
- Barrett, E., Stanton, C., Zelder, O., Fitzgerald, G., Ross, R. P. (2004): Heterologous expression of lactose- and galactose-utilizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of lysine in whey. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2861-2866.
- Becker, J., Wittmann, C., Kind, S. (2012): Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(4), 631-640.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Blokpoel, M. C. J., Murphy, H. N., O'Toole, R., Wiles, S., Runn, E. S. C., Stewart, G. R., Young, B., Robertson, B. D., (2005): Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Research*, 33(2), e22.
- Blombach, B., Schreiner, M. E., Holatko, J., Bartek, T., Oldiges, M., Eikmanns, B. J. (2007): L-Valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2079-2084.
- Browning, D. F., Busby, S. J. W., Szybalski, W., Dove, S. L., Hochschild, A. (2004): The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 297-310.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo Y., Gralla J. D. (2000): The bacterial enhancer-dependent $\sigma(54)$ ($\sigma(N)$) transcription factor. *Journal of Bacteriology*, 182, 4129–4136.
- Busche, T., Šilar, R., Picmanová, M., Pátek, M., Kalinowski, J. (2012): Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* 13, 445.
- Buschke, N., Becker, J., Schäfer, R., Kiefer, P., Biedendieck, R., Wittmann, C. (2013): Systems metabolic engineering of xylose-utilizing *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5 diaminopentane. *Biotechnology Journal*, 8(5), 557-570.
- Cremer, J., Eggeling, L., Sahm, H. (1991): Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1746-1752.

- de la Campa, A. G., del Solar, G. H., Espinosa, M. (1990): Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant DNA regions. *Journal of Molecular Biology*, 213(2), 247-262.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R. (1998): Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 434-464.
- Dominguez, H., Nezondet, C., Lindley, N. D., Coccagn, M. (1993): Modified carbon flux during oxygen-limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. *Biotechnology Letters*, 15, 449-454.
- Dubendorff, J. W., Studier, F. W. (1991): Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219, 45-59.
- Ebright, R. H. (2000): RNA Polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of Molecular Biology*, 304, 687-698.
- Edmondson, S. P., Parker, E. (2012): Plasmids: General principles. In: Brock Biology of Microorganisms (13th). Cummings, B. (ed). Pearson Education, San Francisco, 160.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. (2009): Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *Journal of Bacteriology*, 191, 2964-2972.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W., Sahm, H. (1991a): A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene*, 102(1), 93-98.
- Eikmanns, B. J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M., Sahm, H. (1991b): Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 617-622.
- Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Ludtke, K. U., Sahm, H. (1994): Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology*, 140, 1817-1828.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M., Schaffer, S. (2004): *ClpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ H. *Molecular Microbiology*, 52, 285-302.
- Farewell, A., Diez, A.A., DiRusso, C.C., Nyström, T. (1996): Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth-phase dependent expression of the *uspA*, *fad* and *fab* genes. *Journal of Bacteriology*, 178, 6443-6450.
- Feklistov, A., Darst, S. A. (2011): Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell*, 147, 1257-1269.
- Follettie, M. T., Shin, H. K., Sinskey, A. J. (1988): Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Molecular Microbiology*, 2, 53-62.

- Frewer, L. J., Shepherd, R. (1995): Ethical concerns and risk perceptions associated with different applications of genetic engineering: Interrelationships with the perceived need for regulation of the technology. *Agriculture and Human Values*, 12(1), 48-57.
- Gruber, T. M., Gross, C. A. (2003): Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 57, 441-466.
- Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J., Kormanec, J. (2002): The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiology Letters*, 216, 77-84.
- Hanahan, D., (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
- Hanahan, D., (1985): Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: DNA cloning: practical approach. Glover, D. M. (ed). IRL Press, Oxford, 109-135.
- Hänssler, E., Müller, T., Palumbo, K., Pátek, M., Brocker, M., Krämer, R., Burkovski, A. (2009): A game with many players: control of *gdh* transcription in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 142, 114-122.
- Helmann, J. D. (1999): Anti-sigma factors. *Current Opinion In Microbiology*, 2, 135-141.
- Helmann, J. D. (2002): The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial Physiology*, 46, 47-110.
- Hoffelder, M., Raasch, K., van Ooyen, Y., Eggeling, L. (2010): The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *Journal of Bacteriology*, 192, 5203-5211.
- Holátko, J., Elišáková, V., Prouza, M., Sobotka, M., Nešvera, J., Pátek, M. (2009): Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *Journal of Biotechnology*, 139, 203-210.
- Holátko, J., Šilar, R., Rabatinová, A., Šanderová, Halada, H., Nešvera, J., Krásný, L., Pátek, M. (2012): Construction of in vitro transcription system for *Corynebacterium glutamicum* and its use in the recognition of promoters of different classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 521-529.
- Chamberlin, M., Ring, J. (1973): Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase: 1. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 2235-2244.
- Cheng, Z. (2010): Protein translocation through the Sec61/SecY channel. *Bioscience Report*, 30(3), 201-207.
- Ikeda, M., Katsumata, R. (1998): A novel system with positive selection for the chromosomal integration of replicative plasmid DNA in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology Society Journals*, 144, 1863-1868.
- Ikeda, M., Baba, M., Tsukamoto, N., Komatsu, T., Mitsunashi, S., Taneno, S. (2009): Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 2806-2808.

- Inui, M., Kawaguchi, H., Murakami, S., Vertès, A. A., Yukawa, H. (2004a): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 8, 243-254.
- Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertès, A. A., Yukawa, H. (2004b): Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7, 182-196.
- Ito, H., Sato, K., Enei, H., Hirose, Y. (1990a): Improvement in microbial production of L-tyrosine by gene dosage effect of *aroL* gene coding shikimate kinase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 823-824.
- Ito, H., Sato, K., Matsui, K., Sano, K., Enei, H., Hirose, Y. (1990b): Molecular breeding of a *Brevibacterium lactofermentum* L-phenylalanine producer using a cloned prephenate dehydratase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 190-195.
- Jakob, K., Satorhelyi, P., Lange, C., Wendisch, V. F., Silakowski, B., Scherer, S., Neuhaus, K. (2007): Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *Journal of Bacteriology*, 189, 5582–5590
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, H. Ch., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S. H., Couloux, A., Lee, S. W., Yoon, S. H., Cattolico, L., Hur, C.G., Park, H.S., Ségurens, B., Kim, S. C., Oh, T. K., Lenski, R. E., Studier, F. W., Daegelen, P., Kim, J. F. (2009): Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 644-652.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D. A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegräbe, I., Tauch, A. (2003): The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology*, 104, 5-25.
- Kang, M.K., Lee, J., Um, Y., Lee, T. S., Bott, M., Park, S.J., Woo, H.M. (2014): Synthetic biology platform of CoryneBrick vectors for gene expression in *Corynebacterium glutamicum* and its application to xylose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5991-6002.
- Kawaguchi, H., Vertes, A. A., Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2006): Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3418-3428.
- Keilhauer, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1993): Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5595-5603.
- Khlebnikov, A., Risa, Ø., Skaug, T., Carrier, T. A., Keasling, J. D. (2000): Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. *Journal of Bacteriology*, 182(24), 7029–7034.
- Kim, T. H., Kim, H. J., Park, J. S., Kim, Y., Kim, P., Lee, H. S. (2005): Functional analysis of *sigH* expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1542–1547.

- Kinoshita, S., Tanaka, K., Udaka, S., Akita, S. (1957): Glutamic acid fermentation. *Proceeding of the International Symposium on Enzyme Chemistry*, 2, 464-468.
- Kirchner, O., Tauch, A. (2003): Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 104, 287-299.
- Knoppová, M., Phensajai, M., Veselý, M., Zemanová, M., Nešvera, J., Pátek, M. (2007): Plasmid vectors for testing in vivo promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Current Opinion In Microbiology*, 55, 234-239.
- Kortmann, M., Kuhl, V., Klaffl, S., Bott, M. (2015): A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 253-265.
- Kotrba, P., Inui, M., Yukawa, H. (2003): A single V317A or V317M substitution in Enzyme II of a newly identified beta-glucoside phosphotransferase and utilization system of *Corynebacterium glutamicum* R extends its specificity towards cellobiose. *Microbiology Society Journals*, 149, 1569-1580.
- Larisch, C., Nakunst, D., Hüser, A. T., Tauch, A., Kalinowski, J. (2007): The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genomics*, 8, 4.
- Lausberg, F., Chattopadhyay, A. R., Heyer, A., Eggeling, L., Freudl, R. (2012): A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. *Plasmid*, 68, 142-148.
- Lee, S-G., Liao, J. C. (2008): Control of acetate production rate in *Escherichia coli* by regulating expression of single-copy pta using lacIQ in multicopy plasmid. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(2), 334-337.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., Drauz, K. (2005): Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 1-8.
- Liebl, W., Bayerl A., Schein B., Stillner U., Schleifer, K. H. (1989): High-Efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 65(3), 299-304.
- Liu, Q., Ouyang, S. P., Kim, J., Chen, G. Q. (2007): The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 132, 273-279.
- Mason, C. A., Dünner, J., Indra, P., Colangelo, T. (1999): Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3433-3440.
- Mathew, R., Chatterji, D. (2006): The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends in Microbiology*, 14, 450-455.
- Mauri, M., Klumpp, S. (2014): A model for sigma factor competition in bacterial cells. *PLOS Computational Biology*, 10(10), e1003845.
- Merriman, T. R., Lamont, I. L. (1992): Construction and use of self-cloning promoter probe vector for Gram-negative bacteria. *Gene*, 126, 17-23.

- Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C. O., Blasi, U. (2002): Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Molecular Microbiology*, 43, 239-246.
- Moreau, S., Blanco, C., and Trautwetter, A. (1999): Site-specific integration of corynephage phi16: construction of an integration vector. *Microbiology Society Journals*, 145, 539-548.
- Nakunst, D., Larisch, C., Hüser, A. T., Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J. (2007): The extracytoplasmatic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 1332 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *Journal of Bacteriology*, 189, 4696-4707.
- Nešvera, J., Pátek, M., Hochmannová, J., Abbrámová, Z., Bečvářová, V., Jelínková, M., Vohradský, J. (1997): Plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum* codes for a gene product that positively influences plasmid copy number. *Journal of Bacteriology*, 179, 1525-1532.
- Oguiza, J. A., Marcos, A. T., Martín, J. F. (1997): Transcriptional analysis of the *sigA* and *sigB* genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiology Letters*, 153, 111-117.
- Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M. (2002): A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L -lysine-producing mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 217-223.
- Parikh, A., Kumar, D., Chawla, Y., Kurthkoti, K., Khan, S., Varshney, U., Nandicoori, V. K. (2013): Development of a new generation of vectors for gene expression, gene replacement, and protein-protein interaction studies in *Mycobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1718-1729.
- Park, J. H., Lee, S. Y. (2010): Metabolic pathways and fermentative production of L-aspartate family amino acids. *Journal of Biotechnology*, 5, 560-577.
- Park, S. D., Youn, J. W., Kim, Y. J., Lee, S. M., Kim, Y., Lee, H. S. (2008): *Corynebacterium glutamicum* σ E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- σ factor CseE. *Microbiology Society Journals*, 154, 915-923.
- Pátek, M., Eikmanns, B. J., Pátek, J., Sahm, H. (1996): Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology Society Journals* 142, 1297-1309.
- Pátek, M., Nešvera, J. (2011): Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 154, 101-113.
- Peters-Wendisch, P. G., Schiel, B., Wendisch, V. F., Katsoulidis, E., Möckel, B., Sahm, H., Eikmanns, B. J. (2001): Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, 3, 295-300.
- Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Rückert, C., Kalinowski, J., V. F., Polen, T. (2013): Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genomics*, 14, 173-216.
- Ravasi, P., Peiru, S., Gramajo, H., Menzella HG (2012): Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1-11.

- Ploss, T. N., Reilman, E., Monteferrante, C. G., Denham, E. L., Piersma, S., Lingner, A., Vehmaanperä, J., Lorenz, P., van Dijl, J. M. (2016): Homogeneity and heterogeneity in amylase production by *Bacillus subtilis* under different growth conditions. *Microbial Cell Factories*, 15, 57.
- Reinscheid, D. J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Sahm, H. (1994): Stable expression of hom-1-thrB in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 126-132.
- Rezuchova, B., Kormanec, J. (2001): A two-plasmid system for identification of promoters recognized by RNA polymerase containing extracytoplasmic stress response sigma(E) in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 45(2):103-11.
- Ring, B. Z., Yarnell, W. S., Roberts, J. W. (1996): Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing. *Cell*, 86(3), 485-493.
- Rhodium, V. A., Segall-Shapiro, T. H., Sharon, B. D., Ghodasara, A., Orlova, E., Tabakh, H., Voigt, C. A. (2013): Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters. *Molecular Systems Biology*, 9, 702.
- Rodrigue, S., Provvedi, R., Jacques, P.E., Gaudreau, L., Manganelli, R. (2006): The σ factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(6), 926-941.
- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R. L. (1993): A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407-1413.
- Ruan, Y., Zhu, L., LI, Q. (2015): Improving the electro-transformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* by weakening its cell wall and increasing the cytoplasmic membrane fluidity. *Biotechnology Letters*, 37(12), 2445-2452.
- Ruff, E. F., Record, M. T., Artsimovitch, I. (2015): Initial Events in Bacterial Transcription Initiation. *Biomolecules*, 5(2), 1035–1062.
- Sahm, H., Eggeling, L. (1999): D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1973-1979.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez, S., Demain, A. L. (2008): Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbial Biotechnology*, 1(4), 283-319.
- Santamaría, R., Gil, J. A., Mesas, J. M., Martín, J. F. (1984): Characterization of endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *Journal of General Microbiology*, 130, 2237-2246.
- Sasaki, M., Jojima, T., Kawaguchi, H., Inui, M., Yukawa, H. (2009): Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 105-115.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A. (1994): Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and

pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145, 69-73.

Schneider, K., Beck, Ch. F. (1986): Promoter-probe vectors for the analysis of divergently arranged promoters. *Gene*, 42(1), 37-48.

Smith, K. M., Cho, K. M., Liao, J. C. (2010): Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1045-1055.

Srivastava, P., Deb, J. K. (2002): Construction of fusion vectors of corynebacteria: expression of glutathione-S-transferase fusion protein in *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 21476. *FEMS Microbiology Letters*, 212, 209-216.

Stäbler, N., Oikawa, T., Bott, M., Eggeling, L. (2011): *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-amino acids. *Journal of Bacteriology*, 193, 1702-1709.

Strovas, T. J., Lidstrom, M. E. (2009): Population heterogeneity in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*, 155(6), 2040-2048.

Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, Volume 189(1), 113-130.

Suzuki, N., Tsuge, Y., Inui, M., Yukawa, H. (2005): Cre/loxP-mediated deletion system for large genome rearrangements in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 225-233.

Sørensen, H. P., Mortensen, K. K. (2005): Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4, 1.

Tabor, S., Richardson C.C. (1985): A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 82, 1074-1078.

Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G. (2000): TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in Gram-positive bacteria, shows high homology to Gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid*, 44, 285-291.

Tauch, A., Götker, S., Pühler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G. (2002): The alanine racemase gene *alr* is an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. *Journal of Biotechnology*, 99, 79-91.

Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G. (2003): Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *Journal of Biotechnology*, 104, 27-40.

Toyoda, K., Inui, M. (2016): The extracytoplasmic function σ factor σ^C regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 100, 486-509.

Toyoda, K., Teramoto, H., Yukawa, H., Inui, M. (2015): Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor σ^H in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 197, 483-496.

- Tsuchiya, M., Morinaga, Y. (1988): Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *Biotechnology*, 6, 428-430.
- Unthan, S., Baumgart, M., Radek, A., Herbst, M., Siebert, D., Brühl, N., Bartsch, A., Bott, M., Wiechert, W., Marin, K., Hans, S., Krämer, R., Seibold, G., Frunzke, J., Kalinowski, J., Rückert, C. (2014): Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum* – a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters. *Biotechnology Journal*, 10, 290-301.
- Vašicová, P., Abrahámová, Z., Nešvera, J., Pátek, M., Sahm, H., Eikmanns, B. (1998): Integrating and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology of Techniques*, 12, 743-746.
- Vašicová, P., Pátek, M., Nešvera, J., Sahm, H., Eikmanns, B. (1999): Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* dapA promoter. *Journal of Bacteriology*, 181, 6188-6191.
- Venkova-Canova, T., Pátek, M., Nešvera, J. (2003): Control of *rep* gene expression in plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 185, 2402-2409.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J., Kustu, S. (1991): The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell*, 67(1), 155-167.
- Wieschalka, S., Blombach, B., Bott, M., Eikmanns, B. J. (2013): Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Biotechnology*, 6(2), 87-102.
- Wieschalka, S., Blombach, B., Eikmanns, B. J. (2012): Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 449-459.
- Woods, E. C., Nawrocki, K. L., Suárez, J. M., McBride, S. M. (2016): The *Clostridium difficile* Dlt pathway is controlled by the extracytoplasmic function sigma factor σ^V in response to lysozyme. *Infection and Immunity*, 84(6), 1902–1916.
- Yasuda, K., Jojima, T., Suda, M., Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2007): Analyses of the acetate-producing pathways in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 853–860.
- Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. A. (1999): Crystal Structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution. *Cell*, 98, 811-824.
- Zhang, L., Jia, H., Xu, D. (2015a): Construction of a novel twin-arginine translocation (Tat)-dependent type expression vector for secretory production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 82, 50-55.